

# ARCHIV FÜR MIKROBIOLOGIE

UNIVERSITY OF HAWAII  
LIBRARY  
JUN 24 '64

BEGRÜNDET VON  
J. BEHRENS F. BOAS A. RIPPEL

HERAUSGEGEBEN VON

H. L. JENSEN LYNGBY	C. B. VAN NIEL PACIFIC GROVE	R. NILSSON UPPSALA
G. PIEKARSKI BONN	E. G. PRINGSHEIM GÖTTINGEN vorm. CAMBRIDGE	W. H. SCHOPFER BERN
H. TAMIYA TOKIO	T. WIKÉN DELFT	

UND DEN SCHRIFTFLEITERN

A. RIPPEL-BALDES GÖTTINGEN	R. HARDER GÖTTINGEN
-------------------------------	------------------------

31. BAND · 2. (SCHLUSS-)HEFT

MIT 40 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 28. NOVEMBER 1958)



SPRINGER-VERLAG  
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

1958

Per.  
QR 1  
Ar 25

Arch.  
Mikrobiol.

# Archiv für Mikrobiologie

Zeitschrift für die Erforschung der pflanzlichen Mikroorganismen. Begründet 1930 von  
J. Behrens, F. Boas, A. Rippel. Berlin, Springer

Das „Archiv für Mikrobiologie“ steht Originalarbeiten und Sammelreferaten aus dem Gesamtgebiet der pflanzlichen Mikroorganismen offen. Arbeiten, die nur praktischen Zwecken dienen, scheiden aus, während im übrigen alle wissenschaftlichen Fragen aus „reinen“ und „angewandten“ Gebieten berücksichtigt werden.

Das „Archiv“ erscheint nach Maßgabe des eingehenden Materials. Der Preis des Bandes beträgt DM 96,—.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20,— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 30,— für eine Arbeit. Sammelreferate werden mit DM 40,— für den Druckbogen honoriert.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophotos u. ä. von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Die Mitarbeiter erhalten von ihren Arbeiten 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Manuskripte erbeten an:

Prof. Dr. H. L. Jensen, Lyngby/Dänemark, Statens Planteavls-Laboratorium, Bakteriologisk Afdeling,

Prof. Dr. C. B. van Niel, California/USA, Pacific Grove, Stanford University, Hopkins Marine Station,

Prof. Dr. R. Nilsson, Uppsala 7/Schweden, Kungl. Lantbrukshögskolan, Mikrobiologiska Institutionen,

Prof. Dr. G. Piekarski, Bonn/Rh., Venusberg, Hygienisches Institut, medizinisch-parasitologische Abteilung, der Universität,

Prof. Dr. E. G. Pringsheim, Göttingen, Nikolausbergerweg 18, Pflanzenphysiologisches Institut,

Prof. Dr. W. H. Schopfer, Bern/Schweiz, Botanisches Institut der Universität,

Prof. Dr. H. Tamiya, Tokio/Japan, 41, Mejiro-Machi 4th St., The Tokuwaga Institute for Biological Research,

Prof. Dr. T. Wikén, Delft/Holland, Julianalaan 67 A, Laboratorium voor Microbiologie, Technische Hogeschool

oder an die

*Schriftleitung:*

Prof. Dr. A. Rippel-Baldes, Göttingen, Albrechtstraße 6,

Prof. Dr. R. Harder, Göttingen, Pflanzenphysiologisches Institut, Untere Karspüle 2

**Springer-Verlag**

Berlin · Göttingen · Heidelberg

## 31. Band

## Inhaltsverzeichnis

2. (Schluß-)Heft

Seite

FROMMER, W., Untersuchungen an ActinomycinI-bildenden Streptomyceten und deren Actinomycinen . . . . . 319

ETTLINGER, L., R. CORBAZ und R. HÜTTER, Zur Systematik der Actinomyceten. 4. Eine Einteilung der Gattung Streptomyces Waksman et Henrici. Mit 11 Textabbildungen . . . 326

FRANKE, W., und W. HEINEN, Zur Kenntnis des Fettsäureabbaus durch Schimmelpilze. II. Mitteilung über Fettsäuredehydrasen aus Schimmelpilzen. Mit 6 Textabbildungen . . . . 359

SCHUSSNIG, B., Der Feinbau der Plastiden von Rhopalocystis oleifera. Mit 3 Textabbildungen 379

JÜRGENS, C., Physiologische und genetische Untersuchungen über die Fruchtkörperbildung bei Schizophyllum commune. Mit 8 Textabbildungen. . . . . 388

DRAWERT, H., und INGEBORG METZNER-KÜSTER, Fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an Beggiatoa alba und Thiothrix nivea. VI. Mitteilung der Reihe: Zellmorphologische Studien an Cyanophyceen. Mit 12 Textabbildungen . . . . . 422

Autorenverzeichnis . . . . . 435



(Aus dem Organisch-Chemischen Institut, Biochemische Abteilung,  
der Universität Göttingen)

## Untersuchungen an Actinomycin I-bildenden Streptomyceten und deren Actinomycinen \*

Von  
W. FROMMER

(Eingegangen am 16. Juni 1958)

In einer zusammenfassenden Arbeit beschrieben BROCKMANN u. GRÖNE (1954) die bei der Auftrennung der natürlich vorkommenden Actinomycingemische durch Papier- und Säulenchromatographie gewonnenen Ergebnisse. Sie konnten drei natürlich vorkommende Actinomycine unterscheiden: C, X und I.

Das Actinomycin C läßt sich chromatographisch in die Hauptkomponenten C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> und C<sub>3</sub> (Bezeichnung nach der Lage im Papierchromatogramm), das Actinomycin X in die Hauptkomponenten X<sub>1</sub> und X<sub>2</sub> und die Nebenkomponten X<sub>3</sub> und X<sub>4</sub> auftrennen. X<sub>3</sub> und X<sub>4</sub> konnten nur in einzelnen Fällen aufgefunden werden. Das Actinomycin I besteht zum größten Teil aus Actinomycin I<sub>1</sub>; die Nebenkomponten I<sub>2</sub> und besonders I<sub>3</sub> kommen nur in sehr geringer Menge vor. Daneben konnten bei allen Actinomycingemischen im Papierchromatogramm noch langsamer als die Actinomycine C<sub>1</sub>, X<sub>1</sub> und I<sub>1</sub> laufende Komponenten nachgewiesen werden, die als C<sub>0</sub>, C<sub>0a</sub>, X<sub>0</sub>, X<sub>0a</sub>, I<sub>0</sub> und I<sub>0a</sub><sup>1</sup> bezeichnet wurden. Die Actinomycine C<sub>1</sub>, X<sub>1</sub> und I<sub>1</sub> lassen sich papierchromatographisch auch bei Anwendung mehrerer Lösungsmittelsysteme nicht unterscheiden<sup>2</sup>.

Bei dem erstmals von VINING u. WAKSMAN (1954) beschriebenen Actinomycin D schien es sich anfangs um ein einheitliches Actinomycin zu handeln. Später gelang jedoch auch hier eine Auftrennung in verschiedene Komponenten (VINING, GREGORY u. WAKSMAN, 1955). Nach diesen Angaben handelt es sich um ein Actinomycin des I-Typs mit einer

\* Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Dr. h. c. A. RIPPEL-BALDES, zu seinem 70. Geburtstag gewidmet.

<sup>1</sup> In der Zwischenzeit konnten die o-Komponenten weiter aufgetrennt werden. (BROCKMANN u. PAMPUS 1955, MARTIN u. PAMPUS 1956, BROCKMANN u. MANEGOLD unveröffentlichte Ergebnisse).

<sup>2</sup> BROCKMANN u. GRÖNE (1954) geben für Actinomycin X<sub>1</sub> im System Butanol-n-Dibutyläther (2:3)/10% Natrium-m-kresotinat einen anderen R<sub>F</sub>-Wert an als bei Actinomycin C<sub>1</sub>. Inzwischen hat sich herausgestellt, daß Actinomycin X<sub>1</sub> mit C<sub>1</sub> und I<sub>1</sub> identisch ist (Privat-Mitteilung von Professor BROCKMANN).

Hauptkomponente  $D_1 = I_1$  und verschiedenen in kleinen Mengen auftretenden Nebenkomponten, von denen sich eine im Chromatogramm in verschiedenen Systemen wie  $C_2$  bzw.  $I_2$  verhält. Keine der Nebenkomponten verhielt sich wie Actinomycin  $X_2$ .

Die Übereinstimmung des von *Streptomyces parvullus* Waskman et Gregory (1954) gebildeten Actinomycin D mit dem Actinomycin I bestätigen CORBAZ u. Mitarb. (1957). ROUSSOS u. VINING (1956) allerdings stellen das Actinomycin D zur X-Gruppe.

Die folgenden Versuche sollten zeigen, wie weit die Komponenten-zusammensetzung des Actinomycins I durch Stammauslese und Variation der Kulturbedingungen verändert werden kann, insbesondere ob es sich beim Actinomycin I stoffwechselphysiologisch um einen Sonderfall des Actinomycin C handelt (Actinomycine  $I_1 = C_1$ ,  $I_2 = C_2$ ), bei dem Actinomycin  $C_3$  vollständig fehlt und Actinomycin  $C_2$  nur in geringen Mengen vorhanden ist. Gleichzeitig sollten die Versuche Wege aufzeigen, auf denen die für eine chemische Bearbeitung der Nebenkomponten besonders des Actinomycins  $I_2$  notwendigen Substanzmengen gewonnen werden können.

Der von WAKSMAN u. GREGORY (1954) beschriebene Actinomycin D-Bildner *Streptomyces parvullus* gehört zur achromogenen Gruppe und bildet Luftmycel mit Spiralen. Die 6 von CORBAZ u. Mitarb. (1957) isolierten Actinomycin I-Produzenten zeigen Ähnlichkeit mit *Streptomyces parvullus* Waksman et Gregory (1 Stamm) oder mit *Streptomyces chrysomallus* Lindenbein (1952) (5 Stämme) und sind alle achromogen.

Ganz anders dagegen verhalten sich die in der Instituts-Sammlung des Organisch-Chemischen Instituts der Universität Göttingen vorhandenen Actinomycin I-Bildner *Imme 794* und *Imme 797*. Sie sind chromogen [siehe MARTIN u. PAMPUS (1956)] und zeigen große Ähnlichkeit mit *Streptomyces antibioticus* Waksman et Woodruff. Beide Stämme waren jedoch weitgehend degeneriert. Während Stamm *Imme 794* anfangs auf Glycerin-Glykokoll-Agar<sup>1</sup> vollständig farblos wuchs, bildete Stamm *Imme 797* auf diesem Nährboden nur noch einen eben erkennbaren Schimmer gelben Farbstoffs. Wir wählten daher Stamm *Imme 797* für die weiteren Untersuchungen aus.

### Nährbodenvariation

Durch Veränderung des C/N-Verhältnisses und durch Variation der Stickstoffquellen versuchten wir die Actinomycin-Ausbeute und -Zusammensetzung beim Stamm *Imme 797* zu verändern.

<sup>1</sup> Nach v. PLOTTO: 2 Vol-% Glycerin; 0,25% Glykokoll; 0,1% NaCl; 0,1%  $K_2HPO_4$ ; 0,01%  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ ; 0,01%  $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ ; 0,01%  $CaCO_3$ ; 2% Agar.



Zu der Nährlösung (0,1% NaCl; 0,1%  $K_2HPO_4$ ; 0,01%  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ ; 0,01%  $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ ; 0,01%  $CaCO_3$ ; 2% Agar) gab ich

- I 1% Glycerin a) 0,1 b) 0,25 c) 0,35 d) 0,5% Glykokoll
- II 2% Glycerin a) 0,1 b) 0,25 c) 0,35 d) 0,5% Glykokoll
- III 3% Glycerin a) 0,1 b) 0,25 c) 0,35 d) 0,5% Glykokoll
- IV 5% Glycerin a) 0,1 b) 0,25 c) 0,35 d) 0,5% Glykokoll

oder an Stelle des Glykokolls in äquivalenten Mengen (bezogen auf Stickstoff) Glutaminsäure,  $KNO_3$  oder  $(NH_4)_2HPO_4$ . Außerdem setzten wir die von BROCKMANN u. GRÖNE (1954) zur Actinomycin I-Gewinnung benutzte Kombination 2% Glycerin und 1%  $KNO_3$  an. Von jedem dieser 65 Nährböden wurden 3 Schrägröhrchen<sup>1</sup> (je 8 cm<sup>3</sup>) beimpft und bei 28° C 14 Tage bebrütet.

Nur physiologisch stark alkalische Nährböden (starker Stickstoff-Überschuß) ergaben gutes Wachstum und kräftige Luftmycelbildung. Dies ist das typische Verhalten eines degenerierten Stammes (FROMMER 1955b). Die Farbstoffbildung war insbesondere auf den Glutaminsäure- und  $KNO_3$ -Nährböden sehr stark.

Wir extrahierten die Schrägröhrchen (je 3 zusammen) zur Gewinnung des Actinomycins mit Aceton. Nach dem Abdestillieren des Acetons schüttelten wir die zurückbleibende wäßrige Lösung mit Äther aus, engten den Ätherextrakt bis zur Trockne ein und nahmen das Actinomycin mit Methanol auf.

In allen Fällen war die Ausbeute so gering, daß eine chromatographische Analyse nicht möglich war. Die Actinomycin-Konzentration der Schrägröhrchen lag unter 10 mg/l Kulturlösung. Für eine Actinomycin I-Gewinnung kamen also diese Nährböden nicht in Frage. Bei den gebildeten Farbstoffen handelte es sich um Melanine. Diese treten bei degenerierten Stämmen oft verstärkt auf (FROMMER 1955b).

### Ausleseversuche

Die Degeneration war also bei diesem Stamm so weit fortgeschritten, daß selbst auf physiologisch stark alkalischen Nährböden keine Actinomycin-Bildung mehr auftrat. Wir versuchten daher, die vielleicht noch in der Population vorhandenen aktiven Stämme auszulesen.

Zur Durchtestung einer großen Zahl einzelner Kolonien hat sich auch bei anderen Antibiotica ein Verfahren nach KELNER (1948) gut bewährt (FROMMER 1955a).

Ein für die Actinomycin-Bildung günstiger Nähragar (je 10 cm<sup>3</sup>) wird in Petrischalen mit planem Boden mit filtrierten Sporensuspensionen des zu untersuchenden Stammes, die nur einzelne Sporen, keine Sporenketten enthalten, beimpft und bei 28° C bebrütet. Nach 5—6 Tagen werden die inzwischen gewachsenen Kolonien mit 10 cm<sup>3</sup> einer Diffusionsschicht aus 1% Agar in dest. Wasser übergossen, die nach dem Erstarren mit 3 cm<sup>3</sup> eines bereits mit dem Testbakterium beimpften Bakterienagar<sup>1</sup> überschichtet wird. Nach einer weiteren Bebrütung von 24 Std bei 37° C ist die Bakteriensicht zu einem dünnen Häutchen zusammengeschumpft. Über den Antibiotica-erzeugenden Kolonien haben sich Hemmzonen ausgebildet. Als Testorganismus wurde ein *Bacillus subtilis*-Stamm verwendet.

<sup>1</sup> 1% Glucose; 0,5% Pepton; 1,2%  $K_2HPO_4$ ; 0,25% Agar; pH 7,2.

VON BROCKMANN u. GRÖNE (1954) war die Actinomycin-Bildung des Stammes *Imme 797* nur auf einem  $\text{KNO}_3$ -Nährboden<sup>1</sup> untersucht worden. Dieser Nährboden ist physiologisch sehr stark alkalisch (1%  $\text{KNO}_3$ !), und es war möglich, daß auf ihm viele Kolonien, die eine starke Tendenz zur Säurebildung haben, nur durch die starke physiologische Pufferung in der Lage sind, Antibiotica und damit Hemmzonen zu bilden. Die Gefahr, daß die auf einem solchen Nährboden ausgelesenen Kolonien in den nachfolgenden Passagen schnell degenerieren, ist sehr groß. Auf der anderen Seite war nicht sicher, ob in der Population Kolonien enthalten sind, die auch auf dem weniger stark physiologisch gepufferten Glycerin-Glykokoll-Agar nennenswerte Mengen Actinomycin bilden [KUTZNER (persönliche Mitteilung) stellte bei diesem Stamm auf Glycerin-Glykokoll-Agar keine Hemmzonenbildung fest]. Wir legten daher von beiden Nährböden je etwa 100 Platten an.

Tabelle. Häufigkeitsverteilung der Hemmzonen

Zonen in Millimeter	0	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-18	19-21	22-24	25-27	28-30	31-33	34-36	X <sup>1</sup>	Ge- samt- zahl	Zahl d. Platten	Zahl der Kol. je Platte	Zahl der wirk- samen Kol.	Prozent d. wirks. Kol. bezogen auf Gesamtzahl minus X
Zahl d. Kol. auf Glyc.-Glyk. (5. Tag) . .	1113	4	5	5	3	3	10	7	15	14	17	3	0	161	1360	75	18,0	86	7,2
$\text{KNO}_3$ (5. Tag)	353	2	5	4	6	3	3	3	1	1	0	0	0	18	399	40	10,0	28	8,7
$\text{KNO}_3$ (6. Tag)	198	6	13	5	7	3	4	3	1	1	0	2	3	39	285	29	9,8	48	19,5

<sup>1</sup> Diese Kolonien waren am Rande der Platten oder nahe bei anderen Kolonien gewachsen, so daß die von ihnen gebildeten Hemmzonen nicht ausgemessen werden konnten.

Auf dem  $\text{KNO}_3$ -Nährboden waren die Kolonien nach 5 Tagen viel kleiner als auf Glycerin-Glykokoll, aber viel stärker gefärbt. Auf Glycerin-Glykokoll-Agar hatten die meisten Kolonien ein kräftiges, teils weiß und teils grau gefärbtes Luftmycel ausgebildet. Bei den auf  $\text{KNO}_3$ -Agar gewachsenen Kolonien fehlte das Luftmycel meist oder es war nur als dünner Schleier vorhanden.

Nach 5tägiger Bebrütung wurden auf 75 Glycerin-Glykokoll-Platten und 40  $\text{KNO}_3$ -Platten die Testschichten aufgebracht, am 6. Tag auf weitere 29  $\text{KNO}_3$ -Platten. Die Tabelle zeigt die Häufigkeitsverteilung der Hemmzonen.

Ganz auffallend ist die Tatsache, daß, obwohl beide Nährböden mit derselben Sporensuspension beimpft wurden, sich auf  $\text{KNO}_3$ -Agar nur etwa halb soviel Kolonien bilden wie auf Glycerin-Glykokoll-Agar. Auch eine um 9 Tage verlängerte Bebrütung einzelner Platten änderte an

<sup>1</sup> 2 Vol.-% Glycerin; 1%  $\text{KNO}_3$ ; 0,1% NaCl; 0,1%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,005%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,001%  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 0,001%  $\text{CaCO}_3$ ; 2% Agar.



diesem Verhältnis nichts (siehe Tabelle, auch Kolonienzahl/Platte am 5. und 6. Tag). Die genaue Sporenzahl der Impfsuspension war nicht bekannt. Eine mikroskopische Zählung kann wegen der Kleinheit der Sporen nur sehr schwer durchgeführt werden. Es ist möglich, daß die Summe der auf  $\text{KNO}_3$ - und Glycerin-Glykokoll-Agar gekeimten Sporen nur einen Teil der Gesamtzahl ausmacht. Auch bei Einspor-Isolierungen mit dem Mikromanipulator wachsen nur etwa 10% der Sporen an (FROMMER 1955a). Der Gedanke, daß es sich um biochemische Mutanten handelt, liegt nach den Untersuchungen von SERMONTI u. SPADA-SERMONTI (1955 u. 1956), BRADLEY u. LEDERBERG (1956) sowie SZYBALSKI u. BRAENDLE (1956) nahe. Auf der anderen Seite ist natürlich bei diesem degenerierten Stamm auch an eine Keimungshemmung bei einem Teil der Sporen zu denken.

Die Verteilung der Kolonien auf dem Glycerin-Glykokoll-Agar nach Hemmzonen zeigt neben vielen wenig oder nicht wirksamen Kolonien eine deutliche Anhäufung wirksamer Kolonien mit Zonen von 18 bis 30 mm. Es sind also keine fließenden Übergänge zwischen unwirksamen und stark wirksamen Kolonien vorhanden; es wird entweder nichts (oder sehr wenig) oder viel Actinomycin gebildet. Dies spricht für einen genetischen Unterschied.

Auf dem  $\text{KNO}_3$ -Nährboden treten dagegen nur wenige wirksame Kolonien in gleichmäßiger Verteilung auf.

Am 6. Tag waren die Zonen im Durchschnitt gegenüber dem 5. Tag um etwa 10–11 mm vergrößert und aus einzelnen unwirksamen waren schwach wirksame Kolonien geworden.

Von den Glycerin-Glykokoll-Platten wurden 42, von den  $\text{KNO}_3$ -Platten 17 Kolonien mit den größten Hemmzonen isoliert und auf Glycerin-Glykokoll-Agar abgeimpft. Sehr viele Stämme, insbesondere die aus  $\text{KNO}_3$ -Platten isolierten, zeigten Anzeichen von Degeneration. 11 der isolierten Stämme mit den geringsten Degenerationsanzeichen setzten wir auf Oberflächenkultur in P-Kolben (je 1 l Nährlösung) mit Glycerin-Glykokoll- und  $\text{KNO}_3$ -Nährlösung an.

In Glycerin-Glykokoll-Nährlösung fiel der  $\text{pH}$ -Wert sehr schnell bei allen Stämmen auf etwa  $\text{pH}$  5 (nach 14 Tagen). Das anfangs gebildete Actinomycin wurde später zum Teil wieder abgebaut. Von jedem dieser Kolben konnten nur wenige Milligramm Actinomycin gewonnen werden. Die  $\text{KNO}_3$ -Nährlösung verhinderte diesen  $\text{pH}$ -Abfall mit nachträglichem Abbau des Actinomycins und gab infolgedessen viel bessere Ausbeuten. Die Ausbeuten an Rohactinomycin lagen zwischen 66 und 190 mg/l Kulturlösung, bei den meisten Stämmen über 100 mg/l.

Zur Actinomycin-Gewinnung wurde die vom Mycel abfiltrierte Kulturlösung (je 1 l) bei  $\text{KNO}_3$ -Lösung 2mal, bei Glycerin-Glykokoll-Lösung einmal mit je etwa 200 cm<sup>3</sup> Butylacetat ausgeschüttelt. Nach dem

Einengen des Butylacetatextraktes im Vacuum fällten wir das Rohactinomycin mit Petroläther. Das Mycel enthielt keine nennenswerten Actinomycinmengen und wurde verworfen.

Alle so gewonnenen Präparate untersuchten wir im Papierchromatogramm in den Systemen Butylacetat + n-Dibutyläther (3:1)/10% Natrium-m-kresotinat und n-Dibutyläther + Butanol (3:2)/10% Natrium-m-kresotinat auf ihre Zusammensetzung. In allen Fällen ergab sich das für Actinomycin I typische Bild (siehe BROCKMANN u. GRÖNE 1954). Neben der Hauptkomponente  $I_1$  treten stets in geringer Menge  $I_2$  und je nach Stamm 3—4 verschiedene  $I_0$ -Komponenten auf. In keinem Fall wurde eine sich wie Actinomycin  $X_2$  verhaltende Komponente entdeckt. Auch die inzwischen von DÖRING (pers. Mitteilung) in präparativem Maßstab durchgeführten Versuche brachten dasselbe Ergebnis.

### Diskussion

Der stark degenerierte Actinomycin I-Bildner *Imme* 797 konnte durch Nährbodenvariation nicht dazu gebracht werden, Actinomycin in nennenswerten Mengen zu bilden. Auf Platten erwies sich nur noch ein geringer Prozentsatz der sich entwickelnden Kolonien als antibiotisch wirksam. Durch Auslese konnten aktive Stämme gewonnen werden, die im P-Kolben gute Actinomycin-Ausbeuten ergaben. Jeder der ausgelesenen Stämme gab Actinomycin I. In keinem Fall konnte ein dem Actinomycin C oder X ähnliches Gemisch isoliert werden. Dies spricht für die Konstanz der von diesem Stamm gebildeten Actinomycin-Zusammensetzung.

Da nach den bisherigen Untersuchungen sich die Actinomycine  $C_1$  bzw.  $C_2$  nicht von den Actinomycinen  $I_1$  bzw.  $I_2$  unterscheiden, könnte man Actinomycin I bzw. D als einen Sondertyp des Actinomycins C auffassen, bei denen die Komponenten  $C_2$  und  $C_3$  sehr schwach vertreten sind.

Weitere Untersuchungen an Actinomycin C-Bildnern oder an den von CORBAZ u. a. (1957) beschriebenen zur *Chrysomallus*-Gruppe gehörenden Actinomycin I-Bildnern müßten jedoch erst zeigen, wieweit eine solche Darstellung gerechtfertigt ist.

### Zusammenfassung

Untersuchungen an Actinomycin I-Bildnern zeigen, daß von diesen nur Actinomycin I gebildet wird. In keinem Fall konnte aus diesen Stämmen ein Actinomycin-Gemisch des X- oder C-Typs isoliert werden.

Herrn Professor Dr. H. BROCKMANN danke ich für seine großzügige Unterstützung. Herrn D. BACHMANN möchte ich für seine technische Hilfe danken.



## Literatur

- BRADLEY, S. G., u. J. LEDERBERG: J. Bact. **72**, 235 (1956). — BROCKMANN, H., u. H. GRÖNE: Chem. Ber. **87**, 1036 (1954). — BROCKMANN, H., u. G. PAMPUS: Angew. Chem. **67**, 519 (1955). — CORBAZ, R., L. ETTLINGER, W. KELLER-SCHIERLEIN u. H. ZÄHNER: Arch. Mikrobiol. **26**, 192 (1957). — FROMMER, W.: Arch. Mikrobiol. **23**, 105 (1955a), **23**, 385 (1955b). — KELNER, A.: J. Bact. **57**, 73 (1948). — LINDENBEIN, W.: Arch. Mikrobiol. **17**, 361 (1952). — MARTIN, H. H., u. G. PAMPUS: Arch. Mikrobiol. **25**, 90 (1956). — ROUSSOS, G. G., and L. C. VINING: J. chem. Soc. (London) 1956, 2469. — SERMONTI, G., u. I. SPADA-SERMONTI: Nature **176**, 121 (1955), J. gen. Microbiol. **15**, 609 (1956). — SZYBALSKI, W., u. D. H. BRAENDLE: Bact. Proc. 1956 p. 48. — VINING, L. C., and S. A. WAKSMAN: Science **120**, 389 (1954). — VINING, L. C., F. J. GREGORY and S. A. WAKSMAN: Antibiot. and Chemother. **5**, 417 (1955). — WAKSMAN, S. A., u. H. B. WOODRUFF: J. Bact. **42**, 231 (1941). — WAKSMAN, S. A., and F. J. GREGORY: Antibiot. and Chemother. **4**, 1050 (1954).

(Aus dem Institut für spezielle Botanik der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich)

## Zur Systematik der Actinomyceten\*

### 4. Eine Arteinteilung der Gattung *Streptomyces* Waksman et Henrici\*\*

Von

L. ETTLINGER, R. CORBAZ und R. HÜTTER

Mit 11 Textabbildungen

(Eingegangen am 7. Juni 1958)

Es ist Aufgabe der Streptomyceten-Systematik, ihre Organismen so zu beschreiben, daß sich unbestimmte Stämme eindeutig einer bekannten Art einordnen oder als neu erkennen lassen. Dieses Ziel ist gegenwärtig noch kaum erreicht. Eine Bestimmung nach der Literatur ist deshalb schwierig, weil Merkmale von ganz verschiedenem systematischem Wert zur Beschreibung herangezogen werden und keine Klarheit darüber herrscht, welche als zwingend, artdifferenzierend und welche nur als akzessorisch zu betrachten sind. Dies ist zugleich auch der Grund, warum von rühmlichen Ausnahmen abgesehen (BURKHOLDER et al. 1955) kaum je Synonymien aufgestellt werden. Dazu kommt, daß gegenwärtig die Anschauungen in Fluß geraten sind, und während noch vor kurzem die löslichen Pigmente als Merkmale erster Ordnung galten, machen ihnen heute schon Charakteristica wie Morphologie und Farbe des Luftmycels den Rang streitig. Neu erschlossene Merkmale wie die feinere Morphologie der Sporen können erst im Lauf der Zeit Eingang in die Diagnosen finden.

Unter diesen Umständen ist es erforderlich, auf den Vergleich mit authentischen Stämmen aus Kultursammlungen abzustellen, doch erheben sich hierbei neue Schwierigkeiten. Für eine große Zahl von Arten sind keine Originalkulturen mehr vorhanden, und die Nomenklaturregeln schreiben leider nicht vor, daß dann eine andere Kultur zum Typus erklärt werden müsse. In anderen Fällen sind die Originalstämme aus politischen oder ökonomischen Gründen nicht oder kaum zugänglich. Wo Typus-Kulturen erhältlich sind, weisen sie oft erhebliche Unterschiede zu den Diagnosen auf, und der Bearbeiter steht vor der Frage, ob er an der Echtheit der Kultur zweifeln oder zu der vielberufenen Variabilität der Streptomyceten Ausflucht nehmen soll.

Auf Grund mehrjähriger Erfahrung mit etwa 150 Sammlungsstämmen und 14000 eigenen Isolierungen sind wir zu der Überzeugung gelangt, daß diese Variabilität auf einige auffallende, aber eben unzuverlässige

\* Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. A. RIPPEL zum 70. Geburtstag gewidmet.

\*\* 3. Mitteilung: Arch. Mikrobiol. **26**, 307 (1957).



Merkmale zutrifft, wie die Produktion löslicher Pigmente, Farbe des vegetativen Mycels und antibiotische Aktivität. Daneben existieren eine Reihe von Merkmalen, die wir in dem Sinne für konstant und zuverlässig ansehen, daß sie sich über längere Zeit im Laboratorium mit vielen Abimpfungen nicht verändern, und daß sich die Stämme im Bezug auf sie als homogen erweisen. Ferner sind sie zur Hauptsache unabhängig von Medium, Züchtungsbedingungen und Alter.

Ähnliche Unterscheidungen des systematischen Werts wurden schon von anderen Autoren vorgeschlagen (Literaturübersicht siehe WAKSMAN 1957), doch erreichte man dabei in der Regel mit konstanten Merkmalen nur eine zwischen Species und Genus gelegene Stufe wie Sektion, Serie, Gruppe, worauf man empfahl, diese mit weniger zuverlässigen Eigenschaften weiter in Arten zu unterteilen.

Demgegenüber schlagen wir hier eine Arteinteilung vor, welche auf unzuverlässige oder nicht eindeutig zu bestimmende Merkmale ganz verzichtet. Wir sind dabei von dem Gesichtspunkt ausgegangen, daß die Art, als Grundlage der ganzen Systematik, die kleinste noch mit konstanten Eigenschaften charakterisierbare Einheit darstellen soll. Sie dann weiter in Varietäten usw. zu unterteilen, halten wir für unnötig, doch ist das dem Geschmack jedes Bearbeiters überlassen.

Wir haben 4 Merkmalsgruppen als geeignet zur Artdifferenzierung gefunden, nämlich Morphologie der Sporen, Farbe des Luftmycels, Morphologie des Luftmycels und Fähigkeit zur Melaninbildung; also einerseits vorwiegend morphologische Eigenschaften der reproduktiven Phase des Organismus, was möglicherweise kausal mit der Konstanz verknüpft ist, andererseits ein physiologisches Merkmal, das sich überraschenderweise als zuverlässig bewährt hat.

In der vorliegenden Arbeit haben wir nun unser ganzes Material, bestehend aus den Sammlungstämmen und den näher geprüften eigenen Isolierungen (die aber nur gelegentlich erwähnt werden), nach den ausgeführten Gesichtspunkten in Arten eingeteilt. In der Regel haben wir diejenige Sammlungskultur mit dem ältesten Artnamen als Vertreter der Species gewählt, doch wurde von Prioritätserwägungen abgesehen, wenn Zweifel an der Echtheit des Stamms möglich waren. Arten, für die wir keine Vertreter aus Sammlungen fanden, haben wir als neu beschrieben, da wir es im Rahmen dieser Arbeit für das geringere Übel ansahen, ein Synonym als eine nicht auf direktem Vergleich beruhende Bestimmung zu publizieren. Es ist klar, daß sich unsere Synonymien auf den jeweils untersuchten Stamm beziehen, auf die durch ihn vertretene Species jedoch nur, wenn er als Typus dieses Namens zu gelten hat. Dies zu entscheiden, lag in vielen Fällen weder nach den Nomenklaturregeln noch nach der Zusammensetzung unserer Kultursammlung in unserer Kompetenz. Wir möchten daher auch unsere Arbeit als einen Vorschlag

betrachten, dessen Ausführung anderen zu überlassen ist. Unter diesem Gesichtspunkt haben wir es sogar in Kauf genommen, eine Arteinteilung der Gattung *Streptomyces* aufzustellen, in der die Typusart, *S. albus*, nicht figuriert.

Abgesehen von der Melaninbildung als physiologischem Merkmal, betrachten wir unsere Merkmale untereinander als gleichwertig. Ihre Reihenfolge ist so gewählt, daß die Auswirkungen von Fehlerquellen möglichst beschränkt bleiben. An der Spitze stehen die Sporenmerkmale, die auf jeden Fall eindeutig zu erkennen sind. Es ist uns bewußt, daß nicht jedem Bearbeiter von Streptomyceten ein Elektronenmikroskop zu Diensten steht, doch ist dies kein Grund, eine gute morphologische Merkmalsgruppe zu unterdrücken. Als Hilfsschlüssel zur Bestimmung ohne Sporenmerkmale haben wir Abb. 1 mit dem vollständigen Species-Verzeichnis ausgestattet. Von hier kann man dann zur Luftmycelfarbe im Bestimmungsschlüssel oder in der nach Luftmycelfarben gegliederten Artenliste weiterschreiten. Zur richtigen Beurteilung der Luftmycelfarbe ist eine gewisse Routine Voraussetzung, doch erweist sie sich dann als sehr zuverlässiges und weitreichendes Merkmal. Bei der Morphologie des Luftmycels ist stets mit der Gefahr zu rechnen, daß bei nicht ganz optimalem Wachstum kompliziertere Strukturen übersehen werden. Deshalb erscheint diese am stärksten differenzierte Merkmalsgruppe erst an dritter Stelle.

Am Ende der Artenliste folgt eine Zusammenstellung derjenigen Stämme, die bei uns kein Luftmycel entwickelten, und die wir daher auch nicht einreihen können.

Die Gattung *Streptomyces* fassen wir in der gleichen Weise auf, wie sie in BERGEY VII (1957, S. 744 ff.) definiert ist.

## I. Zur Artdifferenzierung geeignete Merkmale

### 1. Morphologie der Sporen

Die Sporen der Streptomyceten sind im allgemeinen so klein (Durchmesser  $< 1 \mu$ ), daß man ihre morphologischen Besonderheiten mit dem Lichtmikroskop nicht sicher erkennen kann. Zwar wurden schon von älteren Autoren Angaben über Form und Größe der Sporen gemacht und namentlich von KRASSILNIKOV (1949) eine Einteilung der Sporen in runde oder ovale gegenüber oblongen oder zylindrischen als systematisches Merkmal verwendet, doch halten unserer Meinung nach diese Unterscheidungen einer Überprüfung im Elektronenmikroskop nicht stand.

FLAIG (1952) und FLAIG et al. (1952) haben als erste die Sporen einer größeren Anzahl von Stämmen elektronenoptisch untersucht und festgestellt, daß sich dabei nicht nur in der Form, sondern auch in der Oberflächenbeschaffenheit der Sporen für die Systematik vielversprechende



Unterschiede zeigen. KÜSTER (1953) sowie FLAIG et al. (1955) unterscheiden folgende 6 Sporentypen: Sporen mit rauher Oberfläche a) stachlig, b) haarig, c) warzig. — Sporen mit glatter Oberfläche a) lang-oval, b) rund, c) zylindrisch.

In einer vorläufigen Mitteilung (FLAIG u. KUTZNER 1954) wird die Anwendung dieser Merkmale zur Klassifizierung eines größeren Stammmaterials angekündigt, doch zieht KUTZNER (1956) Merkmale der Sporenmorphologie nur in einzelnen Fällen und nur auf der allerletzten Stufe seines Einteilungsschemas zur Unterscheidung heran. Offenbar sind dem Autor die Sporenmerkmale suspekt erschienen, weil sie nicht mit der auf Farbe von Luftmycel, Substratmycel und löslichem Pigment basierenden Gruppeneinteilung parallel gingen.

Nach dem gleichen Kriterium beurteilten BALDACCI u. GREIN (1955) die Brauchbarkeit der Sporenmorphologie für die Systematik. Sie stellten fest, daß die von BALDACCI et al. (1953, 1954) nach Substratmycel- und Luftmycelfarbe aufgestellten Serien einheitlich seien in bezug auf die Sporenform, daß jedoch bei der Oberflächenbeschaffenheit (glatt, stachlig usw.) nicht einmal unter verschiedenen Stämmen einer Art Einheitlichkeit herrsche.

Wir würden in diesem Fall eher an der Einheitlichkeit der betreffenden Art zweifeln, da für uns die Konstanz und Eindeutigkeit des Merkmals selbst ausschlaggebend ist. Wir haben die elektronenoptischen Eigenschaften verschiedener Stämme auf verschiedenen Medien nach verschieden langer Inkubationszeit und zum Teil wiederholt nach längeren Zeitabständen (bis zu 3 Jahren) geprüft und dabei gefunden, daß nicht nur die groben Unterschiede glatt und rauh konstant sind, sondern daß bei den rauhen auch die spezifische Ausbildung der Wandauswüchse stets die gleiche bleibt. Die Sporenform andererseits vermittelt zwar wohl den Eindruck einer gewissen statistischen Konstanz, doch liefert sie für die Systematik keine zwingenden Merkmale, da im gleichen Präparat nie nur eine Form, sondern immer auch alle möglichen Übergänge zu anderen Formen anzutreffen sind. Die Sporengröße ist im allgemeinen, d. h. von gewissen Ausnahmen abgesehen, im Verhältnis zu allfälligen Artunterschieden auch zu variabel, um zur Unterscheidung zu dienen.

Schwierigkeiten bereitete uns die richtige Einordnung der warzigen Sporen. FLAIG u. Mitarb. (l. c.) stellen die Warzen als Wandauswüchse den Stacheln und Haaren gleichrangig zur Seite. ENGHUSEN (1955) dagegen betrachtet sie als Artefakte, die dadurch entstehen, daß die etwas weiteren Sporenhüllen im Vakuum des Elektronenmikroskops auf die Sporen gepreßt werden. Umgekehrt glauben BALDACCI et al. (1956, 1957), daß die Sporenhüllen normalerweise die Wand (Exospore) der Sporen abgeben, und daß die warzigen Sporen Artefakte darstellen, welche aus den im Vakuum gerissenen Exosporen ausgeschlüpft sind.

In unseren Präparaten haben wir niemals stachlige oder haarige Sporen neben glatten beobachtet. Warzige Sporen dagegen kamen nie für sich allein vor, sondern stets mit glatten zusammen. Umgekehrt geben BALDACCI et al. (1956, 1957) eine Abbildung wieder, die 3 warzige Sporen neben einer stachligen zeigt. Wir glauben deshalb, daß man die Warzen nicht als entsprechende Auswüchse wie Stacheln oder Haare werten darf, sondern daß man sie als natürliche oder künstliche Mißbildungen auffassen muß, die bei glatten wie eventuell auch bei stachligen Sporen auftreten können. Es sei auch bemerkt, daß wir warzige Sporen fast immer bei Stämmen gefunden haben, die wie *S. hygroscopicus* im Alter eine schwarze Verflüssigung des Luftmycels erleiden.

Wir unterscheiden somit glatte Sporen einerseits und stachlige oder haarige andererseits. Stacheln sind spitze, starre Auswüchse von relativ beschränkter Länge. Man kann sie noch unterteilen in kurze, an der Basis verbreiterte, Rosendornen-ähnliche und in lange, schlanke aber doch starre, Borsten-ähnliche. Haare sind gleichmäßig dünne, biegsame, sehr lange und zerbrechliche Auswüchse.

Methodik: Mit einem Tröpfchen sterilen Wassers an der Spitze einer Mikropipette streicht man leicht über die sporentragende Oberfläche einer Petrischalen-Kultur. Das Tröpfchen belädt sich praktisch ausschließlich mit Sporen. Es wird auf eine Formvarfolie aufgetragen, die auf einem Netzchen montiert ist, und an der Luft trocknen gelassen. Das Tröpfchen soll groß genug sein, daß es sich auf der ganzen Oberfläche ausbreitet und nicht als Kugel einschrumpft.

## 2. Farbe des Luftmycels

Die Farbe des reifen, versporteten Luftmycels, der „Sporen en masse“, wurde schon von vielen Autoren zur Einteilung der Streptomyceten in Gruppen herangezogen (BALDACCI et al. 1953, 1954, HESSELTINE et al. 1954, FLAIG u. KUTZNER 1954, YAMAGUCHI u. SABURI 1955, KUTZNER 1956, GAUSE 1957, PRIDHAM et al. 1958). Während die Mehrzahl dieser Autoren die Luftmycelfarbe (Sporenfarbe) der Farbe des Substratmycels und der löslichen Pigmente in der Rangordnung gleichstellen oder gar unterordnen, sind HESSELTINE et al. (1954) die ersten, die auf den übertragenden Wert dieses Merkmals dank seiner Konstanz und Unabhängigkeit vom Nährboden hingewiesen haben. In einer späteren Veröffentlichung (PRIDHAM et al. 1958) geben dieselben Autoren ein verbessertes Einteilungsschema an, schreiben aber zugleich, sie seien mit der Gruppierung der Streptomyceten nach Sporenfarben auf gewisse Schwierigkeiten gestoßen. Da der spezielle Teil dieser Publikation nicht wenige Beispiele von Kulturen enthält, die in eine andere Farbgruppe eingereiht sind, als wir ihnen zuteilen, glauben wir, daß es sich hier um Schwierigkeiten technischer Art handelt, die den Wert der Merkmalsgruppe selbst nicht berühren.

Wir gehen von der auf der Erfahrung zweier von uns (R. C. u. R. H.) beruhenden Voraussetzung aus, daß es bei der Einteilung von Farbgruppen



des Luftmycels nicht darum geht, ein kontinuierliches Farbspektrum für praktische Zwecke in willkürliche Sektoren aufzuteilen, über deren Umfang sich diskutieren läßt, sondern vielmehr darum, einige wenige naturgegebene, miteinander unvereinbare Typen zu erkennen und in ihrem Schwankungsbereich richtig gegeneinander abzugrenzen. Von diesem Gesichtspunkt aus sei hier die Literatur an Hand des Einteilungsvorschlags von PRIDHAM et al. (1958), der unseren Anschauungen am nächsten kommt, kurz besprochen und sodann ein eigener Vorschlag begründet.

PRIDHAM et al. (1958) unterscheiden folgende Sporenfarben: 1. White, 2. Olive-buff (buff to tan to olive-buff), 3. Yellow, 4. Blue (blue to blue-green to green), 5. Red (pink to red to lavender to lavender-gray), 6. Gray (light gray to mouse-gray to brown-gray to gray-brown).

Gegenüber der früheren Einteilung von HESSELTINE et al. (1954), die nur 4 Farbgruppen unterschied, besteht der Fortschritt darin, daß die Olivtöne aus der Graugruppe herausgenommen wurden. Für einen Fehler sehen wir es dagegen an, daß man sie selbständig gemacht und nicht mit der Gelbgruppe vereinigt hat, die beide in den Schwankungsbereich des gleichen Typus gehören.

Unrichtig erscheint uns auch die Vereinigung von Blau und Grün in der Blaugruppe. Sie findet sich bei fast allen Autoren und ist wohl nur dadurch zu erklären, daß der Vertreter des Typus Blau, *S. viridochromogenes* oder *S. viridis* sensu Baldacci mit seinem Namen auf Grün hindeutet, was sich aber nicht auf sein rein himmelblaues Luftmycel bezieht. Stämme mit grünem Luftmycel sind anscheinend selten, und so ist auch KUTZNER (1956) bisher der einzige, der sie als selbständigen Typus erkannt und damit die Einteilung von FLAIG u. KUTZNER (1954) erweitert hat.

Einer der schwierigsten Punkte in jedem Einteilungsschema ist die richtige Trennung von Rot und Grau. Hier werden meist die dunkelgrauen Varianten der Rotgruppe fälschlicherweise als Braungrau oder Graubraun zur Graugruppe gestellt (z. B. *S. filipinensis*, *S. violaceoniger* u. a.).

Die Sporenfarbe Schwarz, welche einige Autoren angeben, haben wir nie gesehen. In den meisten Fällen dürfte es sich um die mit Speciesnamen wie *hygroscopicus* oder *nigrescens* verbundene schwarze Verflüssigung des Luftmycels handeln. Da diese noch unaufgeklärte Erscheinung bei verschiedenen Farbgruppen auftreten kann (siehe unten), ist es unrichtig, sie als eigene Gruppe zu betrachten. Andere Angaben beziehen sich auf *S. melanosporus*, eine Art mit zweifelhafter Gattungszugehörigkeit; der CBS-Stamm zeigte bei uns nur schwarzes vegetatives Mycel, aber kein Luftmycel.

Unser eigener Vorschlag umfaßt 6 Farbgruppen, die wir mit lateinischen Farbnamen aus der Terminologie von LINDENBEIN (1952) (englische Übersetzung bei WAKSMAN 1957) bezeichnen, um anzudeuten, daß es

sich beim Namen nicht um die Umschreibung eines bestimmten Farbtons, sondern um die stichwortartige Andeutung eines Typus mit definiertem Schwankungsbereich handelt. Dieser soll im folgenden noch mit einigen Worten umschrieben werden. Den Hinweis auf Farbtafeln oder die Wiedergabe von Farbmustern halten wir für wenig nützlich; dagegen sind für jede Gruppe einige möglichst allgemein zugängliche Stämme mit den Katalogbezeichnungen angegeben, die reichlich Luftmycel in den typischen Farben bilden: 1. *niveus* (schneeweiß), 2. *griseus* (gelblich- bis grünlichgrau), 3. *azureus* (himmelblau), 4. *cinnamoneus* (blaßkarmin bis zimtbraun), 5. *cinereus* (aschgrau), 6. *prasinus* (lauchgrün).

1. *niveus*. Luftmycel zeigt auch in ausgereiftem Zustand keine Farbe, ist schneeweiß; Beispiele: *S. purpurascens* NRRL B-1480; *S. rubrreticuli* NRRL B-1484.

2. *griseus*. Luftmycelfarbe zusammengesetzt aus Gelb und Grün zu verschiedenen Anteilen. Dem stets gelb-grünen Grundton sind wechselnde Mengen Grau beigemischt; Beispiele: *S. griseus*, alle Stämme von WAKSMAN; *S. cellulosa* ATCC 3313, NRRL B-1222, CBS (Krainsky); *S. lipmanii* ATCC 3331, CBS (Waksman u. Curtis); *S. pelletieri* CBS (Ciferri).

3. *azureus*. Einzige Farbkomponente ist Himmelblau; Beispiele: *S. viridochromogenes* NRRL B-1227, CBS (Waksman u. Curtis); *S. chartreusis* NRRL 2287.

4. *cinnamoneus*. Hauptkomponente ist Blaßkarmin. Durch verschieden starke Beimengung von Grau wird die Farbe bis zu Zimtbraun verdunkelt. Zwischen diesen beiden Extremen lassen sich alle Übergänge beobachten; Beispiele: *S. lavendulae* Stamm Waksman; *S. fradiae* NRRL B-1195; *S. erythraeus* ATCC 11635; *S. venezuelae* CBS (ATCC).

5. *cinereus*. Hauptkomponente ist stets Aschgrau. In kleinen Anteilen können Farben wie Zimtbraun, Himmelblau, Grünlichgelb oder Olivgrün beigemischt sein, doch verlieren sich diese Farbkomponenten in der Regel, sobald das Luftmycel üppig ausgebildet ist; Beispiele: *S. parvulus* ATCC 12430; *S. antibioticus* ATCC 8663; *S. olivaceus* ATCC 3335; *S. griseoflavus* CBS (Ciferri); *S. noursei* ATCC 11455.

Einen abweichenden Typus, bei dem das Luftmycel auch in reifem Zustand bläulichgrau (*plumbeus*) bleibt, haben wir bisher einzig bei *S. albogriseolus* NRRL B-1305 beobachtet.

6. *prasinus*. Einzige Farbkomponente ist Lauchgrün; Beispiele: *S. prasinus* ETH 12493; *S. hirsutus* ETH 16660; *S. prasinopilosus* ETH 13765.

Zur Methodik: Es empfiehlt sich, für jeden Stamm verschiedene Medien nebeneinander zu benutzen. Zwei Fehlerquellen sind speziell zu beachten: Zu junges, unreifes Luftmycel und durchscheinende Exopigment- oder Substratmycelfarbe, insbesondere bei spärlicher Ausbildung



des Luftmycels. HESSELTINE et al. (1954) bemerken mit Recht, man müsse jeder Luftmycel-Farbangabe „weiß“ mit Verdacht begegnen, da es sich meist um unreife, junge Kulturen handle. Ebenso sind unreife Stadien von *cinereus* und *cinnamoneus* kaum auseinanderzuhalten. Stämme mit wirklich weißem Luftmycel sind besonders schwer zu erkennen, da sie meist zugleich auch stark gefärbte Pigmente in Substrat und Substratmycel besitzen, die durchscheinen. Hier helfen Medien, welche die störenden Farben etwas hintanhaltend, ohne die Ausbildung des Luftmycels zu beeinträchtigen. Es sei bemerkt, daß die meisten Arten, die wir hier unter Luftmycel *niveus* einordnen, in der Literatur mit irgendwelchen Farbbezeichnungen für das Luftmycel zu finden sind. Überhaupt kann man sich viele sonst unverständliche Luftmycel-Farbangaben der Literatur nur als durch das Substratmycel oder Pigment suggeriert erklären.

### 3. Morphologie des Luftmycels

Mikroskopisch beobachtbare Strukturen der Sporenketten, wie Spiralen, Quirle, verschiedene Verzweigungsarten, wurden schon von vielen Autoren zur Artunterscheidung herangezogen. Über ältere Literatur siehe WAKSMAN (1957), der selbst immer wieder auf die Wichtigkeit dieser Merkmalsgruppe hingewiesen und ihr in der neuesten Auflage des BERGEY (VII) größere Beachtung geschenkt hat. Nach Vorarbeiten von BURKHOLDER et al. (1954) und HESSELTINE et al. (1954), die zeigten, daß es sich hier um konstante, praktisch auch vom Medium unabhängige Merkmale handelt, haben nun PRIDHAM, HESSELTINE u. BENEDICT (1958) eine auf der Morphologie des Luftmycels basierende Einteilung der Gattung *Streptomyces* in Sektionen vorgenommen, die hier vor allem besprochen werden soll. Sie unterscheiden folgende 7 Sektionen:

1. *Rectus-Flexibilis* (RF): Sporophoren gerade, gewellt oder in Büscheln; keine Spiralen. — 2. *Retinaculum-Apertum* (RA): Sporophoren als Haken, offene Schlingen oder stark auseinandergezogene (primitive) Spiralen. — 3. *Spira* (S): Sporophoren entweder als kurze, knorrige, zusammengedrückte oder als auseinandergezogene, lange, offene Spiralen. — 4. *Monoverticillus* (MV): Sporophoren als primäre Quirle an langen, geraden Ästen; keine Spiralen. — 5. *Monoverticillus Spira* (MV-S): ebenso, Elemente der Quirle in Spiralen. — 6. *Biverticillus* (BIV): Sporophoren als doppelte Quirle an langen, geraden Ästen; keine Spiralen. — 7. *Biverticillus-Spira* (BIV-S): ebenso, Elemente der Quirle in Spiralen.

Angehörige von 4 dieser Sektionen, nämlich 1 (RF), 2 (RA), 3 (S) und 6 (BIV) haben die Autoren selbst beobachtet, während auf die Existenz der 3 übrigen nur unkontrollierte Literaturangaben hindeuten.

Wir glauben, daß es streng genommen keine *monoverticillaten* gibt, daß also die Sektionen 4 und 5 nicht existieren, bzw. nicht von 6 und 7 unterschieden werden können. Bei unserem Material jedenfalls waren immer auch sekundäre Quirle voll ausgebildet oder wenigstens durch

Verzweigungen angedeutet, wenn überhaupt primäre Quirle vorlagen. Wir möchten daher anregen, die Sektionen 4 und 6 zu *Verticillus* (*V*) sowie 5 und 7 zu *Verticillus-Spira* (*V-S*) zusammenzuziehen.

Für die Existenz von *Verticillus-Spira* können wir 2 selbst kontrollierte Beispiele angeben: *S. noursei* (6)\* mit dem Originalstamm und einer eigenen Isolierung sowie *S. tendae* (20); (vgl. Abb. 1, c).

Ferner sei auf eine Kombination hingewiesen, die in der besprochenen Einteilung nicht vorgesehen, aber wohl bei *S. echinatus* (7) verwirklicht ist: *Verticillus-Retinaculum Apertum* (vgl. Abb. 1, e).

Auch sonst halten wir dieses System für erweiterungsbedürftig, denn es schiene uns reichlich schematisch, eine so ausgesprochene Struktur wie die von *S. ramulosus* (28) (Abb. 1, h) zu *Rectus-Flexibilis* zu stellen.

Da unser Ziel ein ganz anderes war als das der genannten Autoren, haben wir die Differenzierung dieser Merkmalsgruppe sehr viel weiter getrieben. Für uns handelte es sich ja nicht darum, ein Gruppenschema aufzustellen, in das sich möglichst viele der sehr heterogenen Literaturangaben einbauen lassen, sondern wir wollten bis zu den kleinsten mit konstanten Merkmalen unterscheidbaren Einheiten, den Arten, vordringen und für die bekannten Species nur auf selbst an Kulturen beobachtete Eigenschaften abstellen.

Im Bestimmungsschlüssel (S.341) haben wir bei der Luftmycel-Morphologie 8 verschiedene Gegensatzpaare verwendet. Diese sind zwar nicht alle unabhängig voneinander, indem gewisse Paare Spezialfälle übergeordneter Merkmale darstellen, ergeben aber doch eine sehr große Zahl theoretischer Kombinationsmöglichkeiten. Von diesen haben wir in unserem Material 15 Typen verwirklicht gefunden, die in Abb. 1, a—p ohne irgendein Einteilungsprinzip nebeneinandergestellt sind. Wir glauben, sie alle voneinander mit Sicherheit unterscheiden zu können, außer vielleicht l und p, die aber mit andern Merkmalen zu differenzieren sind. Es ist sehr wohl möglich, daß mit der Zeit noch weitere, neue Typen gefunden werden. Eine Einordnung unserer Typen in die Sektionen von PRIDHAM et al. (1958) läßt sich mit der einen erwähnten Ausnahme leicht durchführen und ergibt folgende Gliederung: 1. (*RF*) = d, h, i, l, o, p. — 2. (*RA*) = f, m. — 3. (*S*) = b, g, k, n. — 4. + 6. (*V*) = a. — 5. + 7. (*V-S*) = c. — . . (*V-RA*) = e. Zum besseren Verständnis des Bestimmungsschlüssels und der Legende seien hier noch die verwendeten Begriffe an Hand der Abbildungen erklärt:

Die Sporenketten entstehen bei a, b, c, d, e und h, im Gegensatz zu allen anderen, als Seitenzweige an langen, sterilen Lufthyphen (als unterer Bildabschluß ist jeweils das Substrat bzw. Substratmycel zu denken). Entspringen auf der gleichen Höhe des Hauptastes mehr als

\* Eingeklammerte Zahlen bedeuten die Laufnummer der Art in der Artenbeschreibung S.342 ff.



2 Seitenzweige, wie bei a, c und e, so nennt man diese Verzweigung einen Quirl. Die Sporenketten selbst können gerade sein wie bei a, h und p oder gewellt wie bei d, i, l und o oder zu Spiralen gewunden wie bei den übrigen 8. Bleiben Radius und Steigung aufeinanderfolgender Windungen konstant, so sind die Spiralen regelmäßig wie bei b, c, g, k und n, andernfalls unregelmäßig wie bei e, f und m. Die Spiralen sind geschlossen, wenn die Windungen eng aufeinanderliegen wie bei n, sonst sind sie auseinandergezogen, offen. Die Verzweigungsart ist sympodial, wenn sich keine bevorzugte Hauptachse erkennen läßt wie bei i und o, sonst ist sie monopodial wie bei allen anderen. (Diese Unterschiede lassen sich an den schematischen Zeichnungen weniger leicht erkennen als an den Kulturen selbst, wo man alle möglichen Wachstumsstadien nebeneinander sieht.) Bei den sympodialen unterscheiden wir Büschel wie i, die sich fast ungestielt verzweigen, von gestielten Bäumchen wie o.

Regelmäßigkeiten im Drehsinn der Spiralen, die von älteren (Übersicht bei WAKSMAN 1957) wie auch neueren (z. B. KUTZNER 1956) Autoren immer wieder herangezogen werden, konnten wir trotz gründlicher Untersuchungen nicht feststellen.

Alle Beobachtungen wurden durch direktes Mikroskopieren wachsender Petrischalen-Kulturen auf einem beliebigen, für die Ausbildung von Luftmycel günstigen Medium gewonnen.

#### 4. Chromogenität

Es gibt Streptomyceten, die auf gewissen, Tyrosin-haltigen Nährböden wie Fleischextrakt-Pepton-Agar u. a. schwarze, melanoide Verfärbungen hervorrufen und andere, welche dieselben Medien unverfärbt lassen. Diese Erscheinung hat bei den Streptomyceten als ältestes Artmerkmal gedient (vgl. WAKSMAN 1957), mit dem man die *Species albus* (nicht verfärbend) von der *Species chromogenes* (verfärbend) unterschied.

Die Einteilung chromogen — nicht chromogen ist historisch zu verstehen und bezieht sich nur auf Melaninbildung. Sie hat zu Mißverständnissen Anlaß gegeben, indem manche Autoren dem Wortsinn nach die Bedeutung von chromogen auch auf andere Farbstoffe ausdehnten.

Es wird allgemein angenommen, daß die chromogenen Stämme sich durch den Besitz einer Tyrosinase von den nicht chromogenen unterscheiden. Man bezeichnet daher auch vielfach die chromogenen als Tyrosinase-positiv und die nicht chromogenen als -negativ. Diese Ausdrucksweise ist insofern unkorrekt, als man nicht die Enzymreaktion selbst prüft, sondern die durch einige Umwandlungs- und Polymerisationsschritte von ihr entfernte Melaninbildung. Wir unterscheiden daher in den folgenden Diagnosen zwischen „Melaninbildung“ bei chromogenen Arten und „keiner Melaninbildung“ bei nicht chromogenen.



Abb. 1. Mikroskopische Morphologie des Luftmyceles.

a Sporenketten in Quirlen an sterilen Lufthyphen, gerade *netropsis* (19), *reticuli* (26), *rubri-reticuli* (15). b Sporenketten als Seitenzweige an sterilen Lufthyphen, in offenen Spiralen *purpurascens* (2). c Sporenketten in Quirlen an sterilen Lufthyphen, in offenen, mehr oder weniger regelmäßigen Spiralen *noursei* (6), *tendae* (20). d Sporenketten als Seitenzweige an sterilen Lufthyphen, gerade oder gewellt *fulvissimus* (17), *phaeochromogenes* (18). e Sporenketten in Quirlen an sterilen Lufthyphen, in offenen, unregelmäßigen Spiralen *echinatus* (7). f Sporenketten monopodial verzweigt, erst an den Enden langer, gerader Stücke mit offenen, unregelmäßigen Spiralen versehen *larentulae* (22). g Sporenketten monopodial verzweigt, mit kurzer, gerader Hauptachse und offenen, regelmäßigen Spiralen *parvulus* (33).





Abb. 1 (Fortsetzung)

h Sporenketten an sterilen Lufthyphen, mit mehrfachen kurzen, monopodialen und einigermaßen rechtwinkligen Verzweigungen *ramulosus* (28). i Sporenketten sympodial verzweigt, in Büscheln mit kurzer Hauptachse *griseus* (13), *michiganensis* (14). k Sporenketten monopodial verzweigt, mit langer, gerader Hauptachse und in offenen, regelmäßigen Spiralen *flavescens* (12), *fradiae* (24), *galilaeus* (34), *griseoflavus* (10), *hirsutus* (4), *niveoruber* (16), *pilosus* (11), *prasino-pilosus* (5), *prasinus* (3), *viridochromogenes* (1). l Sporenketten monopodial verzweigt, gerade oder gewellt *antibioticus* (30), *olivaceus* (29). m Sporenketten monopodial verzweigt, auf der ganzen Länge in offenen, unregelmäßigen Spiralen *aureofaciens* (32), *erythraeus* (25), *macrosporeus* (9). n Sporenketten monopodial verzweigt, enge, geschlossene Spiralen *albogriseolus* (8), *hygroscopicus* (31), *violaceoniger* (23). o Sporenketten sympodial verzweigt, in Bäumchen mit langer Hauptachse *viridogenes* (27). p Sporenketten monopodial verzweigt, auffallend steif und gerade *venezuelae* (21)

Zur Prüfung auf Melaninbildung wurde in noch unpublizierten Versuchen (L. E.) folgende Methodik ausgearbeitet: Das Medium besteht aus 0,1% L-Tyrosin; 0,1% Hefeextrakt Difco; 0,85% Natriumchlorid; 1,6% Agar; Leitungswasser. Abfüllen in Reagensgläser zu 4—5 ml, Sterilisieren im Autoklav (120° C, 20 min); Stichkultur im Doppel, Inkubation bei 27° C, Ablesen nach 1—2 Tagen und nochmals nach 4 Tagen. Melaninbildende Stämme geben eine fast schwarze Verfärbungszone. Bei nicht chromogenen können sich andere Farbstoffe nach so kurzer Inkubationszeit noch kaum störend bemerkbar machen. Es läßt sich eindeutig und ohne Zuhilfenahme quantitativer Abstufungen zwischen positiv und negativ unterscheiden.

### 5. Kombination der Merkmale

Es sei bemerkt, daß wir nur einen kleinen Teil der mit 4 Merkmalsgruppen möglichen Kombinationen verwirklicht gefunden haben. So kommen die Luftmycelfarben *griseus* und *cinnamoneus* bisher nur bei Stämmen mit glatten Sporen vor, während umgekehrt die Luftmycelfarben *azureus* und *prasinus* nur bei Stämmen mit stachlig-haarigen Sporen zu finden sind. Alle Stämme mit stachlig-haarigen Sporen besitzen auch Sporenketten in Spiralen. Alle Stämme mit Luftmycel *griseus* besitzen gleiche Luftmycel-Morphologie: gewellte Sporenketten in sympodialen Büscheln. Ob es sich bei einem Teil dieser Beobachtungen um feste Korrelationen handelt oder ob in Zukunft weitere Kombinationen gefunden werden, läßt sich nicht beurteilen.

## II. Andere Merkmale

Die folgenden Merkmalsgruppen, die heute noch eine wichtige Rolle in der Streptomyceten-Systematik spielen, möchten wir ihrer Variabilität wegen eliminieren: Lösliches Pigment, antibiotische Aktivität und Farbe des vegetativen Mycels.

### 1. Lösliches Pigment

Hierunter versteht man die ins Substrat diffundierenden Farbstoffe. Es handelt sich meist um sehr auffallende Farben, insbesondere auf synthetischen Nährböden. Seit der Einführung solcher Medien (KRAINSKY 1914, WAKSMAN u. CURTIS 1916) haben denn auch die löslichen Pigmente als primäre Unterscheidungsmerkmale der Streptomyceten gedient. Dem schon früh geäußerten Einwand, daß ihre Ausbildung in starkem Maße von den Ernährungs- und Wachstumsverhältnissen abhängen, glaubte man durch genaue Standardisierung der Züchtungsbedingungen sowie auch durch möglichst scharfe Charakterisierung der Farbnuancen begegnen zu können. Schwerer wiegt aber eine andere Seite ihrer Variabilität: die Uneinheitlichkeit der Stämme. Es dürfte



leicht sein, aus jeder pigmentbildenden Kultur eine unpigmentierte Tochterkultur herauszuzüchten (Beispiel: Rhodomycinproduzenten; CORBAZ et al. 1957). Sie zeigt sich auch im Fall gewisser, zu *S. griseus* gehörender Actidionbildner, die nebeneinander 2 lösliche Pigmente, ein hellgrünes und ein ziegelrotes, ausscheiden; ohne jedes Zutun und ohne ersichtlichen Grund kann das rote Pigment im Lauf mehrerer Passagen verschwinden, um dann ebenso unvermutet einmal wieder aufzutauchen.

### 2. Antibiotische Aktivität

Was über lösliche Pigmente gesagt wurde, gilt ebenfalls für die Antibiotica, die ja in vielen Fällen mit jenen identisch sind. Auch hier handelt es sich um Fähigkeiten, die unseres Erachtens dem Stamm, nicht der Art angehören, die sich leicht verlieren, und deren Manifestierung in hohem Grad von den Züchtungsbedingungen wie auch von den Prüfungsmethoden abhängt. Wie wenig ein rohes Aktivitätsspektrum aussagt, weiß jeder, der schon vor der Aufgabe stand, unbekannte Antibiotica zu bestimmen. Einer Verwendung der antibiotischen Aktivität zur Artcharakterisierung steht auch entgegen, daß viele Stämme mehr als ein Antibioticum zugleich bilden, die andererseits einzeln vorkommen oder sich mit noch anderen Antibiotica kombinieren können; ferner, daß anscheinend gleiche Antibiotica verschiedener Stämme sich bei näherer Untersuchung als verschieden, wenn auch zur gleichen Gruppe gehörig, erweisen (Beispiel: Actinomycine; unter anderem CORBAZ et al. 1957). Man müßte hier den Aufwand sehr weit treiben und erhielte für die Systematik doch wenig Ausbeute, da z. B. ein negatives Resultat ja nicht Abwesenheit eines Antibioticums, sondern nur eine für den betreffenden Test unschwellige Produktion bedeutet.

### 3. Farbe des vegetativen Mycels

Von ihr versprochen sich BALDACCIO et al. (1953, 1954) größere Unabhängigkeit von den Züchtungsbedingungen und damit auch größere Konstanz, weshalb sie die Substratmycelfarbe zum primären Einteilungsprinzip ihrer Serien erhoben. Daß sich auch diese Eigenschaft im Lauf der Inkubationszeit stark verändern kann, zeigt z. B. der Stamm *S. flavus* ATCC 3369, bei dem junge Kulturen ein goldgelbes, ältere ein schwarzes Substratmycel aufweisen. Für die Abhängigkeit vom Nährboden können wir den Stamm *S. pelletieri* CBS (Ciferri) anführen, der auf fast allen Nährböden ein weinrotes Substratmycel besitzt wie die viomycinproduzierenden Stämme *S. griseus* var. *purpureus* (von denen er sonst nicht zu unterscheiden ist); auf Calciummalat-Agar dagegen ist das vegetative Mycel sattgelb. Die eben genannten Viomycinproduzenten liefern ein gutes Beispiel für die Heterogenität der Stämme in der Substratmycelfarbe: Bei Einsporkulturen pflegen 2—3% der Kolonien

gelbbraunes statt weinrotes Substratmycel zu zeigen, und durch Behandlung mit mutagenen Mitteln kann man diesen Prozentsatz noch stark erhöhen (CORBAZ, unpub.).

Sehr schöne Beispiele für die Variabilität von Substratmycel und löslichem Pigment finden sich bei DUGGAR et al. (1954) und BACKUS et al. (1954).

Wir möchten zum Schluß noch an einem Beispiel die Schwierigkeiten von Artentrennungen mit Pigment, Antibioticum und Substratmycel demonstrieren. *S. viridochromogenes* und *S. chartreusis* werden durch folgende Eigenschaften unterschieden: *S. chartreusis* besitzt hellgelbgrünen Revers und bildet als Antibioticum das grüne Pigment Chartreusin. *S. viridochromogenes* besitzt schwärzlichen Revers und bildet kein antibiotisches Pigment. Sonst sind sie gleich. Man erhält nun leicht aus *S. viridochromogenes* Einsporkulturen mit hellgelbem Revers und kann bei diesen Zwischenformen nicht mehr entscheiden, ob es sich um *S. viridochromogenes* handelt, der den schwarzen Revers oder um *S. chartreusis*, der das antibiotische Pigment verloren hat.

#### 4. C-Quellenspektren

Wir haben früher schon darauf hingewiesen, daß die C-Quellenspektren nur beschränkten systematischen Wert besitzen (ZÄHNER u. ETTLINGER 1957). Eine Fortsetzung dieser Arbeit (CORBAZ, HÜTTER unpub.) legt den Schluß nahe, daß sie zur Artdifferenzierung vorläufig noch ungeeignet sind. Selbst bei sorgfältigster Ausführung sind die Ergebnisse mit zu großen Unsicherheiten belastet, als daß sie zwingende Schlüsse erlaubten. Der Prozentsatz unentschiedener ( $\pm$ ), wiederholungsbedürftiger Resultate bleibt auch nach einer Beschränkung auf verhältnismäßig zuverlässige C-Quellen noch immer erheblich. Dazu kommt, daß in vielen Fällen auch die Kontrollen ohne Zusatz einer C-Quelle Wachstum zeigen, so daß sich hier auch die negativen Resultate nur quantitativ, nicht qualitativ von den positiven unterscheiden. Wir glauben, daß vor einer nutzbringenden Anwendung der C-Quellenmethode auf die Streptomycceten-Systematik zuerst ein Eindringen in den Mechanismus der positiven und negativen Resultate erforderlich wäre.

Mit der N-Quellenmethode besitzen wir keine eigene Erfahrung.

#### 5. Verschiedene physiologische Eigenschaften

Einige auch in neueren Diagnosen benützte Tests, wie das Verhalten auf Stärkeplatten, Gelatinestich und Lackmusmilch, halten wir für systematisch wenig wertvoll. Wirklich negative Stämme haben wir weder bei der Stärkehydrolyse noch bei der Gelatineverflüssigung angetroffen, und eine Abstufung nach der relativen Stärke der enzymatischen Aktivität erscheint uns bei der Grobheit der Untersuchungsmethoden recht



willkürlich. Bei den mit Lackmusmilch zu beobachtenden Erscheinungen (Peptonisierung, Koagulierung, Färbung) sind die Unterschiede zwischen genau gleich behandelten Parallelen oft schon so groß, daß sie jede Verwertung ausschließen.

Andere physiologische Tests, wie Nitratreduktion, Celluloseabbau, Rohrzuckerinversion, haben wir nicht selbst geprüft.

Ob man mit neueren, z. B. auf serologischen Eigenschaften (OKAMI 1956) oder Phagenempfindlichkeit (WELSCH et al. 1957) beruhenden Methoden zu systematisch verwertbaren Kriterien gelangen kann, läßt sich noch nicht überblicken.

### III. Schlüssel zum Bestimmen der Arten

(Die Zahlen in Klammern geben die laufende Nummer der Beschreibung an.)

1	Sporen stachlig oder behaart . . . . .	2
1*	Sporen glatt . . . . .	13
2	Luftmycel azureus (1) <i>S. viridochromogenes</i>	
2*	Luftmycel anders . . . . .	3
3	Luftmycel niveus (2) <i>S. purpurascens</i>	
3*	Luftmycel anders . . . . .	4
4	Luftmycel prasinus . . . . .	5
4*	Luftmycel cinereus . . . . .	7
5	Sporen mit kurzen, < 0,2 $\mu$ langen Stacheln (3) <i>S. prasinus</i>	
5*	Sporen mit längeren Stacheln oder mit Haaren . . . . .	6
6	Sporen mit > 1 $\mu$ langen starren Stacheln (4) <i>S. hirsutus</i>	
6*	Sporen mit flexiblen Haaren (5) <i>S. prasinopilosus</i>	
7	Sporenketten in Quirlen . . . . .	8
7*	Sporenketten nicht in Quirlen . . . . .	9
8	Sporenketten in offenen Spiralen; keine Melaninbildung (6) <i>S. noursei</i>	
8*	Sporenketten in geschlossenen Spiralen; Melaninbildung (7) <i>S. echinatus</i>	
9	Sporenketten in geschlossenen Spiralen (8) <i>S. albogriseolus</i>	
9*	Sporenketten in offenen Spiralen . . . . .	10
10	Spiralen unregelmäßig (9) <i>S. macrosporeus</i>	
10*	Spiralen regelmäßig . . . . .	11
11	Sporen stachlig (10) <i>S. griseoflavus</i>	
11*	Sporen behaart . . . . .	12
12	Spiralen mit > 5 Windungen; Melaninbildung (11) <i>S. pilosus</i>	
12*	Spiralen mit < 5 Windungen; keine Melaninbildung (12) <i>S. flaveolus</i>	
13	Luftmycel griseus . . . . .	14
13*	Luftmycel anders . . . . .	15
14	keine Melaninbildung (13) <i>S. griseus</i>	
14*	Melaninbildung (14) <i>S. michiganensis</i>	
15	Luftmycel niveus . . . . .	16
15*	Luftmycel anders . . . . .	19
16	Sporenketten in Quirlen (15) <i>S. rubririticuli</i>	
16*	Sporenketten nie in Quirlen . . . . .	17
17	Sporenketten gerade oder gewellt . . . . .	18
17*	Sporenketten in Spiralen (16) <i>S. niveoruber</i>	
18	keine Melaninbildung (17) <i>S. fulvissimus</i>	
18*	Melaninbildung (18) <i>S. phaeochromogenes</i>	

19	Luftmycel cinnamoneus . . . . .	20
19*	Luftmycel cinereus . . . . .	26
20	Sporenketten in Quirlen . . . . .	21
20*	Sporenketten nie in Quirlen . . . . .	22
21	Sporenketten gerade oder gewellt (19) <i>S. netropsis</i>	
21*	Sporenketten in Spiralen (20) <i>S. tendae</i>	
22	Sporenketten gerade (21) <i>S. venezuelae</i>	
22*	Sporenketten in Spiralen . . . . .	23
23	Spiralen erst am Ende langer, gerader Sporenketten; Melaninbildung (22) <i>S. lavendulae</i>	
23*	Spiralen anders; keine Melaninbildung . . . . .	24
24	Spiralen geschlossen (23) <i>S. violaceoniger</i>	
24*	Spiralen offen . . . . .	25
25	Spiralen regelmäßig, meist > 5 Windungen (24) <i>S. fradiae</i>	
25*	Spiralen unregelmäßig, meist < 5 Windungen (25) <i>S. erythraeus</i>	
26	Sporenketten in Quirlen (26) <i>S. reticuli</i>	
26*	Sporenketten nie in Quirlen . . . . .	27
27	Sporenketten gerade oder gewellt . . . . .	28
27*	Sporenketten in Spiralen . . . . .	31
28	Sporenketten in sympodial verzweigten Bäumchen (27) <i>S. viridogenes</i>	
28*	Sporenketten monopodial verzweigt . . . . .	29
29	Sporenketten als Seitenzweige steriler Lufthyphen, mehrmals kurz rechtwinklig verzweigt (28) <i>S. ramulosus</i>	
29*	Sporenketten anders . . . . .	30
30	keine Melaninbildung (29) <i>S. olivaceus</i>	
30*	Melaninbildung (30) <i>S. antibioticus</i>	
31	Spiralen geschlossen (31) <i>S. hygroscopicus</i>	
31*	Spiralen offen . . . . .	32
32	Spiralen unregelmäßig, meist < 5 Windungen (32) <i>S. aureofaciens</i>	
32*	Spiralen regelmäßig, meist > 5 Windungen . . . . .	33
33	keine Melaninbildung (33) <i>S. parvulus</i>	
33*	Melaninbildung (34) <i>S. galilaeus</i>	

#### IV. Beschreibung der Arten

##### A. Sporen stachelig oder behaart

###### I. *Luftmycel azureus*

1. *Streptomyces viridochromogenes* (Krainsky) Waksman et Henrici [BERGEY VI, S. 942 (1948)].

Syn.: *Actinomyces viridochromogenes* Krainsky [Zbl. Bakt. II. Abt. 41, 649 (1914)].

Untersuchte Kulturen: NRRL B-1227 Stamm Waksman (ATCC 3356, ETH 11885), Typus (?); CBS Stamm Waksman u. Curtis (ETH 9523), Typus (?); CBS Stamm Millard (ETH 9525); CBS Stamm De Vries (ETH 9522); ETH 9343 eigene Isolierung.

Sporen mit an der Basis verbreiterten, spitz zulaufenden, bis  $0,2\mu$  langen Stacheln (Abb. 2). — Luftmycel hellblau, meist wollig. — Sporenketten in zahlreichen offenen, regelmäßigen Spiralen, meist lang (bis zu 10 Windungen), monopodial verzweigt, mit langer, gerader Hauptachse (Abb. 1, k). — Melaninbildung.



Hierher gehört: *S. chartreusis* NRRL 2287 (ETH 12395), Typus (?); *S. chartreusis* ETH 7302 eigene Isolierung, Chartreusinbildner; *S. chartreusis* ETH 13007 eigene Isolierung, Chartreusinbildner; *S. chartreusis* ETH 13212 eigene Isolierung, Chartreusinbildner.

Zur Frage der Unterscheidbarkeit von *S. viridochromogenes* und *S. chartreusis* siehe oben S. 340.

## II. *Luftmycel niveus*

2. *Streptomyces purpurascens* Lindenbein [Arch. Mikrobiol. 17, 371 (1952)].

Untersuchte Kulturen: CBS Stamm NRRL B-1480 (ETH 11126), Typus (?); ETH 9386 eigene Isolierung.

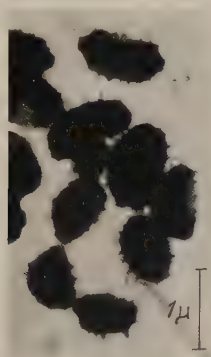


Abb. 2. Sporen von *S. viridochromogenes*, ETH 9523

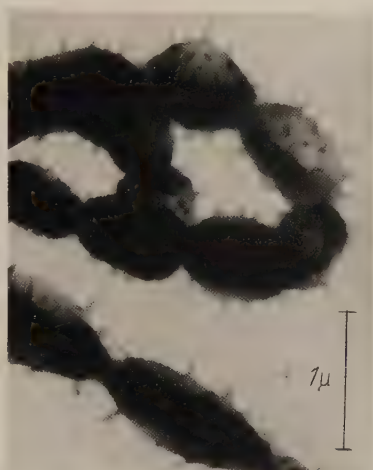


Abb. 3. Sporen von *S. prasinus*, ETH 13815

Sporen mit bis zu  $0,5\mu$  langen, an der Basis leicht verbreiterten Stacheln [Abb. siehe CORBAZ et al. (1957) S. 328]. — Luftmycel schneeweiß, wollig. — Sporenketten als Seitenzweige an sterilen Lufthyphen in offenen, kurzen Spiralen von meist 2—3 Windungen (Abb. 1, b). — Melaninbildung.

## III. *Luftmycel prasinus*

3. *Streptomyces prasinus* nov. spec.

Untersuchte Kulturen: ETH 13815 aus Erdprobe von Mallorca, Typus; ETH 12943 aus Erdprobe von Stanleyville, belg. Kongo.

Sporen mit kurzen, bis  $0,2\mu$  langen, an der Basis wenig verbreiterten Stacheln (Abb. 3). — Luftmycel anfänglich grasgrün, später dunkelgrün. — Sporenketten monopodial verzweigt, mit langer, gerader Hauptachse, in offenen, kurzen Spiralen von meist nur 1—2 Windungen (Abb. 1, k). — Keine Melaninbildung.

Synthetischer Agar<sup>1</sup>: Wachstum schleierartig, farblos; Luftmycel sanftig, lauchgrün. — Synthetische Lösung: Sediment punktförmig, hellgelb; Pellicula punktförmig mit aschgrauem bis lauchgrünem Luftmycel, ebenso Randwachstum;

<sup>1</sup> Rezepte und Terminologie nach LINDENBEIN (1952).

Substrat bräunlichgelb. — Glucose-Agar: Wachstum punktförmig, farblos. — Glucose-Asparagin-Agar: Wachstum punktförmig, weißgelb. — Calciummalat-Agar: Wachstum schleierartig, kupferrot; Luftmycel samtig, lauchgrün. — Gelatinestich (18° C): Wachstum sehr spärlich; Stich punktförmig, weißgelb; Verflüssigung. — Stärkeplatte: Wachstum schleierartig, rötlichbraun; Luftmycel samtig, lauchgrün; Hydrolyse sehr stark, nach 4 Tagen 13 mm, nach 1 Woche 15 mm. — Kartoffeln: Wachstum spärlich; Substratmycel hellbraun, Luftmycel lauchgrün. — Karotten: kein Wachstum. — Lackmusmilch: Sehr dicke Pellikula, Luftmycel mehl-grauweiß bis grünlichgrau, nach 1 Woche lauchgrün; nach 4 Tagen langsame Peptonisierung, nach 1 Woche etwa 1,5 cm; keine Koagulation; Lackmus blau.

Beide Stämme ohne antibiotische Aktivität.



Abb. 4. Sporen von *S. hirsutus*,  
ETH 16660



Abb. 5. Sporen von *S. prasinopilosus*, ETH 13765

#### 4. *Streptomyces hirsutus* nov. spec.

Untersuchte Kulturen: ETH 16660 aus Erdprobe von Bergün, Kt. Graubünden, Typus; ETH 16281 aus Erdprobe von Pfäffikon, Kt. Schwyz.

Sporen mit bis zu  $0,6 \mu$  langen, auch an der Basis schmalen, starren Stacheln (Abb. 4). — Luftmycel dunkelgrün. — Sporenketten in kurzen, offenen, regelmäßigen Spiralen von meist etwa 3 Windungen; monopodial verzweigt (Abb. 1, k). — Keine Melaninbildung.

Synthetischer Agar: Wachstum schleierartig farblos; Luftmycel anfangs spärlich, milchweiß, später lauchgrün. — Synthetische Lösung: Sediment, Flocken weißgrau; Oberflächenwachstum punktförmig mit weißgrauem Luftmycel. — Glucose-Agar: Wachstum punktförmig, farblos; Luftmycel fehlt. — Glucose-Asparagin-Agar: Wachstum punktförmig, farblos; Luftmycel fehlt. — Calciummalat-Agar: Wachstum anfangs punktförmig, milchweiß, später mit Luftmycel, das vom Rande her sich langsam lauchgrün verfärbt. — Gelatinestich (18° C): Wachstum im Stich pustelförmig, weißgelb und mit spärlichem, lauchgrünem Luftmycel; Verflüssigung sehr langsam, nach 10 Tagen Spur. — Stärkeplatte: Wachstum schleierartig, milchweiß; Luftmycel lauchgrün; Hydrolyse nach 4 Tagen 0,5 cm, nach 1 Woche 0,7 cm. — Kartoffeln: Wachstum schleierartig, farblos; Luftmycel anfangs kreideweiß, nach 1 Woche lauchgrün. — Karotten: Wachstum sehr spär-

lich, farblos; Luftmycel spärlich, lauchgrün. — Lackmusmilch: Sehr dicke Pelli-  
kula, hellgelb; Luftmycel spärlich, weißgrau, Koagulation nach 5 Tagen voll-  
ständig; keine Peptonisierung; Lackmus farblos.

Beide Stämme ohne antibiotische Aktivität.

#### 5. *Streptomyces prasinopilosus* nov. spec.

Untersuchte Kultur: ETH 13765 aus Erdprobe von Porto Cristo, Mallorca, Typus.

Sporen mit bis zu  $2\mu$  langen, biegsamen, zerbrechlichen, sehr feinen  
Haaren (Abb. 5). — Luftmycel dunkelgrün. — Sporenketten in kurzen,  
offenen, regelmäßigen Spiralen von meist  
nur 1—3 Windungen; monopodial verzweigt  
(Abb. 1, k). — Keine Melaninbildung.

Synthetischer Agar: Wachstum schleierartig,  
ziegelrot oder rotbraun; Substrat rosa; Luftmycel  
samtig, lauchgrün mit weißen Tupfen. — Syn-  
thetische Lösung: Sediment, Flocken rosa; Sub-  
strat rosa; Pelli-  
kula mit lauchgrünem Luftmycel. —  
Glucose-Agar: Wachstum sehr spärlich, schleier-  
artig, ziegelrot. — Glucose-Asparagin-Agar:  
Wachstum schleierartig, ziegelrot; Substrat ziegel-  
rot; Luftmycel samtig weiß bis lauchgrün. —  
Calciummalat-Agar: Wachstum spärlich, schleier-  
artig, ziegelrot; Substrat rosa; Luftmycel lauch-  
grün. — Gelatinestich ( $18^{\circ}\text{C}$ ): Sediment, Flocken  
anfangs milchweiß bis gelblich, später ziegelrot;  
wenig Ringwachstum; Luftmycel fehlt; Substrat  
unverfärbt; langsame Verflüssigung, nach 26 Tagen  
0,9 cm. — Stärkeplatte: Wachstum schleierartig,  
rosa; Substrat wenig rosa; Luftmycel samtig,  
schneeweiß bis lauchgrün; Hydrolyse nach 4 Tagen  
0,4 cm, nach 10 Tagen 1,4 cm. — Kartoffeln:  
Wachstum sehr langsam, schleierartig, fleischrot;  
Substrat unverfärbt; Luftmycel samtig, lauch-  
grün. — Karotten: Kein Wachstum. — Lackmusmilch: Pelli-  
kula runzelig; Luft-  
mycel samtig, weißgrau; Peptonisierung nach 14 Tagen vollständig, Koagulation  
ziemlich stark; Lackmus rot.

Schwache antibiotische Aktivität gegenüber Gram-positiven Bak-  
terien.

#### IV. *Luftmycel cinereus*

##### 6. *Streptomyces noursei* Brown et al. [Science 117, 609 (1953)].

Untersuchte Kulturen: ATCC 11455 N. Y. State Dept. Health No. 48240 (ETH  
13473), Typus; ETH 13554 eigene Isolierung.

Sporen mit feinen, etwa  $0,4\mu$  langen, schmalen Stacheln (Abb. 6). —  
Luftmycel erst weiß, dann rötlichgrau, schließlich aschgrau. — Sporen-  
ketten als Seitenzweige an sterilen Lufthyphen, hie und da in Quirlen, in  
offenen Spiralen (Abb. 1, c). — Keine Melaninbildung.

In der Originaldiagnose [siehe WAKSMAN u. LECHEVALIER (1953) und  
BERGEY VII] fehlt der Hinweis auf Quirle, und auch PRIDHAM et al.



Abb. 6. Sporen von *S. noursei*,  
ETH 13554



(1958) führen diese Art unter *Retinaculum-Apertum* auf. Wir konnten aber bei beiden Stämmen mit Sicherheit Quirle beobachten.

7. *Streptomyces echinatus* Corbaz et al. [Helv. chim. Acta 40, 199 (1957)].

Untersuchte Kulturen: ETH 8331 eigene Isolierung, Typus; ETH 8972 eigene Isolierung.

Sporen mit bis  $0,4\ \mu$  langen, sehr fein ausgezogenen, schlanken Stacheln (Abb. siehe CORBAZ et al. l. c. S. 200). — Luftmycel anfangs weiß bis gelblich, schließlich aschgrau. — Sporenketten in Quirlen an sterilen Lufthyphen, in offenen, unregelmäßigen Spiralen (Abb. 1, e). — Melaninbildung.



Abb. 7. Sporen von *S. albogriseolus*, ETH 16834

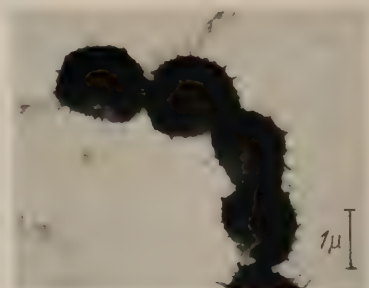


Abb. 8. Sporen von *S. macrosporeus*, ETH 7534

8. *Streptomyces albogriseolus* Benedict et al. [Antibiot. and Chemother. 4, 653 (1954)].

Untersuchte Kultur: NRRL B-1305 (ETH 16834), Typus.

Sporen mit bis  $1,5\ \mu$  langen, feinen, biegsamen, zerbrechlichen Haaren (Abb. 7). — Luftmycel bläulichgrau, oft mit weißen Flecken. — Sporenketten monopodial verzweigt, enge, geschlossene Spiralen (Abb. 1, n). — Keine Melaninbildung.

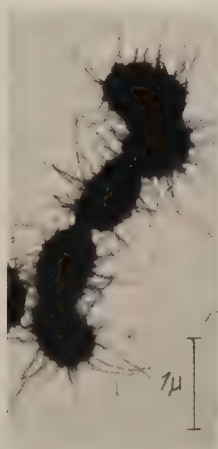
Der bläulichgraue Ton des Luftmycels paßt in keine unserer 6 Farbgruppen, aber doch eher zu *cinereus* als zu *azureus*. Wir haben den Organismus hierhergestellt, um nicht auf einen einzigen Stamm eine neue Farbgruppe zu gründen.

9. *Streptomyces macrosporeus* nov. spec.

Untersuchte Kultur: ETH 7534 aus einer Bodenprobe von Madras, Indien, Typus.

Sporen etwa doppelt so groß wie die der meisten anderen *Streptomyces*-Arten, was schon im Lichtmikroskop auffällt (etwa  $1,7\text{--}2 \cdot 1,5\text{--}2\ \mu$ ); mit  $0,4\text{--}0,6\ \mu$  langen Stacheln (Abb. 8). — Luftmycel anfänglich weiß, schließlich aschgrau. — Sporenketten in offenen, unregelmäßigen, kurzen Spiralen (Abb. 1, m). — Keine Melaninbildung.

Synthetischer Agar: Wachstum anfangs punktförmig, später schleierartig, weißgelb bis sattgelb oder dottergelb; Luftmycel samtig, weißgelb bis weißgrau; Substrat goldgelb. — Synthetische Lösung: Sediment spärlich, milchweiß. — Glucose-Agar: Wachstum runzelig, goldgelb; Luftmycel samtig, weißgelb. — Glucose-Asparagin-Agar: Wachstum punktförmig bis schleierartig, milchweiß; Luftmycel fehlt; Substrat weißgelb. — Calciummalat-Agar: Wachstum schleierartig, dottergelb; Luftmycel samtig, weißgelb bis aschgrau; Substrat weißgelb. — Gelatinestich (18° C): Wachstum spärlich, Verflüssigung langsam, nach 34 Tagen 1,7 cm. — Stärkeplatte: Wachstum punktförmig bis schleierartig, hellgelb; Luftmycel samtig, weißgrau; Hydrolyse nach 1 Woche 1,3 cm. — Karstoffeln: Wachstum üppig, runzelig, hellgelb bis goldgelb; Luftmycel samtig, aschgrau. — Karotten: Wachstum spärlich, punktförmig, farblos. — Lackmusmilch:

Abb. 9. Sporen von *S. griseoflavus*, ETH 11663Abb. 10. Sporen von *S. pilosus*, ETH 12450

Ringwachstum und Pellikula runzelig, hellgelb bis hellbraun; Luftmycel samtig, kreideweiß bis weißgrau; Koagulation stark; keine Peptonisierung; Lackmus blau.

Produziert das Antibioticum Carbomycin.

*10. Streptomyces griseoflavus* (Krainsky) Waksman et Henrici [BERGEY VI, 948 (1948)].

Syn.: *Actinomyces griseoflavus* Krainsky [Zbl. Bakt. II. Abt. **41**, 662 (1914)].

Untersuchte Kulturen: CBS Stamm Ciferri A 28 No. 1118 (ETH 10249); ETH 11663 eigene Isolierung.

Sporen mit 0,2—0,3  $\mu$  langen, an der Basis leicht verbreiterten Stacheln (Abb. 9). — Luftmycel aschgrau. — Sporenketten in offenen, regelmäßigen Spiralen; monopodial verzweigt, mit langer, gerader Hauptachse (Abb. 1, k). — Keine Melaninbildung.

Hierher gehört:

*Actinomyces egypti* Gohar et al. [Gaz. Egypt. Pediatr. Assoc. **2**, 285 (1954)].

Untersuchte Kultur (ETH 11943) erhalten durch Prof. BÜCHT, ETH, Typus.

*11. Streptomyces pilosus* nov. spec.

Untersuchte Kultur: ETH 11686 aus Erdprobe von Rom, Typus.

Sporen mit sehr feinen, bis 1,5  $\mu$  langen, zerbrechlichen Haaren (Abb. 10). — Luftmycel aschgrau. — Sporenketten in sehr langen,

offenen, regelmäßigen Spiralen; monopodial verzweigt mit langer, gerader Hauptachse (Abb. 1, k). — Melaninbildung.

Synthetischer Agar: Wachstum schleierartig, gelb bis gelbbraun; Luftmycel staubig, kreideweiß bis graublau. — Synthetische Lösung: Sediment, Flocken weißgelb, Pellikula ebenso; Luftmycel samtig, kreideweiß; Substrat weißgelb. — Glucose-Agar: Wachstum schleierartig, weißgelb. — Glucose-Asparagin-Agar: Wachstum schleierartig, hellgelb; Luftmycel staubig, kreideweiß, am Rande aschgrau. — Calciummalat-Agar: Wachstum schleierartig, weißgelb bis gelbbraun; Luftmycel samtig, weißgelb bis weißgrau. — Gelatinestich (18° C): Wachstum schleierartig, gelbbraun; Verflüssigung langsam und spärlich; Luftmycel mehlig bestäubt, kreideweiß; Substrat braunschwarz. — Stärkeplatte: Wachstum schleierartig, gelbbraun bis rotgelb; Luftmycel spärlich, mehligweiß bis aschgrau; Hydrolyse nach 10 Tagen 0,6 cm. — Kartoffeln: Wachstum schleierartig bis runzelig, goldgelb; Luftmycel samtig, aschgrau; Substrat braunschwarz. — Karotten: Wachstum sehr spärlich, punktförmig. — Lackmusmilch: Ringwachstum und Pellikula weißgrau bis graublau; Luftmycel samtig, aschgrau; schwache Peptonisierung; keine Koagulation; Substrat braun.

Zeigt antibiotische Aktivität.

12. *Streptomyces flaveolus* (Waksman) Waksman et Henrici [BERGEY VI, S. 936 (1948)].

Syn.: *Actinomyces flaveolus* Waksman [BERGEY I, S. 368 (1923)].

Untersuchte Kultur: ATCC 3319 Stamm Waksman (ETH 12399), Typus (?).

Sporen mit bis 1  $\mu$  langen, feinen, zerbrechlichen Haaren [Abb. siehe VERNON, Nature **176**, 935 (1955)]. — Luftmycel aschgrau. — Sporenketten in ziemlich kurzen, regelmäßigen Spiralen; monopodial verzweigt mit langer, gerader Hauptachse (Abb. 1, k). — Keine Melaninbildung.

## B. Sporen glatt

### I. *Luftmycel griseus*

13. *Streptomyces griseus* (Krainsky) Waksman et Henrici [BERGEY VI, S. 948 (1948)].

Syn.: *Actinomyces griseus* Krainsky [Zbl. Bakt. II. Abt. **41**, 662 (1914)].

Untersuchte Kultur: Streptomycin-Stamm, erhalten von Prof. WAKSMAN 1945 (ETH 4289).

Sporen glatt. — Luftmycel gelblich-grünlichgrau. — Sporenketten meist stark gewellt; sympodial verzweigte Büschel mit kurzer Hauptachse (Abb. 1, i). — Keine Melaninbildung.

Hierher gehören: [bei den mit \* bezeichneten Arten werden in den Diagnosen (vgl. BERGEY VI u. VII) Spiralen angegeben. Die von uns hier untersuchten Kulturen zeigten niemals Spiralen. Es ist möglich, daß die stark gewellten Sporenketten von *S. griseus* hie und da für Spiralen angesehen werden].

*S. albidoflavus* CBS Stamm Duché (ETH 10209). — *A. albidus*\* CBS Stamm Duché (ETH 16824), Typus (?). — *S. albosporus*\* ATCC 3003 Stamm Waksman (ETH 13074). — *S. albus*\* CBS Stamm Beijerinck (ETH 13490). — *S. albus*\* ATCC 3004 Stamm Waksman (ETH 20200). — *S. albus*\* NRRL B-1685. — *S. albus* var. *cretaceus* CBS Stamm Wollenweber (ETH 13488), Typus (?). — *S. albus* var. *ochroleucus* CBS Stamm Wollenweber (ETH 13489), Typus (?). — *A. alni* CBS



Stamm v. Plotho (ETH 16825). — *S. aureus*\* CBS Stamm Waksman u. Curtis (ETH 13492). — *S. aureus*\* ATCC 3309 Stamm Waksman 371 (ETH 20195). — *S. californicus*\* CBS Stamm Waksman u. Curtis (ETH 10212), Typus (?). — *S. candidus* ATCC 4878 Stamm Scudder 19741 (ETH 16700). — *S. cellulosa* CBS Stamm Krainsky (ETH 13493), Typus (?). — *S. cellulosa* ATCC 3313 Stamm Waksman (ETH 20196). — *S. cellulosa* NRRL B-1222 (ETH 16836). — *S. chrysomallus* ATCC 11523 (NRRL 2250, Waksman 3657, ETH 12398), Typus. — *S. citreus*\* ATCC 10974 Stamm Waksman 3574 (ETH 14305). — *S. coelicolor* CBS Stamm Müller (ETH 9533 u. ETH 9534). — *S. coelicolor* CBS Stamm Beijerinck (ETH 20720); andere Stämme *S. coelicolor* siehe *S. fradiae* (24). — *S. griseus* var. *purpureus* NRRL 2423 (CBS Stamm NRRL, ETH 11884 u. ETH 20731), Typus von *S. floridae*. — *S. lipmanii* CBS Stamm Waksman u. Curtis (ETH 13494), Typus (?). — *S. lipmanii* ATCC 3331 Stamm Waksman (ETH 20199), Typus (?). — *S. microflavus*\* CBS Stamm Krainsky (ETH 10206), Typus (?). — *S. odorifer* ATCC 6246 Stamm Waksman (ETH 13079). — *A. oligocarophilus* CBS Stamm Beijerinck (ETH 16832). — *S. olivochromogenus*\* ATCC 3336 Stamm Waksman (NRRL B-1341, ETH 11886 u. ETH 14310), Typus (?). — *A. paraguayensis* CBS Stamm Gammel (ETH 14849). — *S. parvus*\* NRRL B-1455 Stamm Benedict (ATCC 12429, Waksman 3686, ETH 12647 u. ETH 14317). — *S. pelletieri* CBS Stamm Ciferri (ETH 10247). — *S. praecox*\* ATCC 3374 Stamm Waksman (ETH 13078). — *A. praecox*\* CBS Stamm Millard (ETH 20733), Typus (?). — *S. purpeochromogenus*\* ATCC 3343 Stamm Waksman (ETH 13076), Typus (?). — *S. purpeochromogenus*\* CBS Stamm Waksman u. Curtis (ETH 13495), Typus (?). — *A. roseodiateticus* CBS Stamm Duché (ETH 16827), Typus (?). — *S. ruber* CBS Stamm Waksman u. Curtis (ETH 9871). — *S. scabies* ATCC 10246 Stamm Cornell Univ. Nr. 54 (ETH 20198). — *S. scabies* CBS Stamm Millard (ETH 20726) — *S. scabies* CBS Stamm de Vries (ETH 20725); anderer Stamm *S. scabies* siehe *S. olivaceus* (29). — *A. setonii* CBS Stamm Millard (ETH 16833), Typus (?). — *S. sulphureus* ATCC 3007 Stamm Waksman (ETH 14311). — *S. willmorei*\* ATCC 6867 Stamm NCTC 1865 (ETH 16706), Typus (?).

Hierzu sind einige Anmerkungen erforderlich.

Es fällt auf, daß hier *S. albus* (ROSSI-DORIA 1891), die Typusart der Gattung *Streptomyces*, mit allen 3 untersuchten Stämmen aus 3 verschiedenen Kultursammlungen figuriert. Entgegen den Diagnosen besitzen diese Stämme keine Spiralen. Sie sind also entweder keine echten Vertreter der Species *S. albus*, oder aber *S. griseus* ist nur ein jüngeres Synonym zu *S. albus*. Diese Frage sollte von zuständiger Seite entschieden werden.

Ähnliche Einwände, daß es sich um unsichere, relativ junge Vertreter alter Species handelt, kann man bei allen anderen Namen erheben, die älter sind als *S. griseus*, nämlich *S. albidoflavus*, *A. alni*, *S. odorifer*, *S. pelletieri*, *S. scabies* und *S. sulphureus*. Keiner von ihnen rechtfertigt es in unseren Augen, eine so bekannte und wichtige Art wie *S. griseus* aufzugeben.

Über den aufgeführten Stamm *S. parvus* bemerken WAKSMAN u. GREGORY (1954) mit Recht, er besitze keine Spiralen und dürfe daher nicht zu *S. parvus* gestellt werden. Um so überraschender ist es, daß WAKSMAN (1957) diesen Stamm nicht nur als echten *S. parvus* gelten

läßt, sondern ihn geradezu als Beweis dafür verwendet, daß es möglich sei, richtige Bestimmungen nur nach Literaturangaben auszuführen.

*S. aureus* soll nach BERGEY nicht nur Spiralen, sondern auch ein Luftmycel „gray, becoming cinnamon-drab“ besitzen. Die beiden aufgeführten Stämme waren eindeutig *griseus*.

Über *S. scabies* siehe unten bei *S. olivaceus* (29).

14. *Streptomyces michiganensis* Corbaz et al. [Arch. Mikrobiol. 26, 192 (1957)].

Untersuchte Kulturen: ETH 9001 eigene Isolierung, Typus; ETH 14411 eigene Isolierung; ETH 15229 eigene Isolierung.

Sporen glatt. — Luftmycel gelblich-grünlichgrau. — Sporenketten gewellt, in sympodial verzweigten Büscheln mit kurzer Hauptachse (Abb. 1, i). — Melaninbildung.

## II. *Luftmycel niveus*

15. *Streptomyces rubrireticuli* Waksman et Henrici [BERGEY VI, S. 945 (1948)].

Syn.: *Actinomyces reticulus-ruber* Waksman [Soil Sci. 8, 146 (1919)]; *Actinomyces reticulus* Bergey et al. [BERGEY II, S. 373 (1925)].

Untersuchte Kultur: NRRL B-1484 (ETH 14320).

Sporen glatt. — Luftmycel weiß. — Sporenketten gerade, in einfachen bis doppelten Quirlen an sterilen Lufthyphen (Abb. 1, a). — Keine Melaninbildung.

Die in der Literatur angegebene hellrote Farbe des Luftmycels beruht auf dem Durchscheinen der Substratmycelfarbe. Spiralen, wie sie WAKSMAN (l.c.) auf Glucose-Agar erwähnt, haben wir weder auf diesem noch auf anderen Nährböden beobachten können.

16. *Streptomyces niveoruber* nov. spec.

Untersuchte Kulturen: ETH 17860 aus Erdprobe von Grimsby, England, Typus; ETH 17403 aus Erdprobe von Marzell, Deutschland.

Sporen glatt. — Luftmycel weiß. — Sporenketten in offenen, regelmäßigen Spiralen; monopodial verzweigt, mit langer, gerader Hauptachse (Abb. 1, k). — Keine Melaninbildung.

Synthetischer Agar: Wachstum schleierartig, hellgelb oder karminrot bis fleischrot; Luftmycel spärlich, kreideweiß. — Synthetische Lösung: Sediment, Flocken, hellgelbrot bis blaßkarmin; Substrat blaßkarmin. — Glucose-Agar: Wachstum schleierartig bis runzelig, weißgelb bis karminrot oder menningrot; Luftmycel üppig, weiß; Substrat wenig karminrot. — Calciummalat-Agar: Wachstum schleierartig, hellgelb bis blaßkarmin; Luftmycel fehlt. — Gelatinestich (18°C): Oberflächenwachstum runzelig bis flechtenartig, karminrot; Luftmycel spärlich; Verflüssigung nach 28 Tagen nur Spur. — Stärkeplatte: Wachstum schleierartig bis runzelig, hellgelbrot bis karminrot; Luftmycel üppig, weiß; Hydrolyse nach 10 Tagen 0,2 cm. — Kartoffeln: Wachstum pastelig, hellbraun; Luftmycel staubig, kreide-

weiß. — Karotten: kein Wachstum. — Lackmusmilch: Pellicula gut ausgebildet, hellgelb; Luftmycel spärlich; keine Peptonisierung und nur spärliche Koagulation; Lackmus blau oder farblos.

Beide Stämme produzieren das Antibioticum Cinerubin.

17. *Streptomyces fulvissimus* (Jensen) Waksman et Henrici [BERGEY VI, S. 946 (1948)].

Syn.: *Actinomyces fulvissimus* Jensen [Soil Sci. **30**, 66 (1930)].

Untersuchte Kultur: NRRL B-1453, isoliert und bestimmt durch Dr. BENEDICT (ETH 11887).

Sporen glatt. — Luftmycel weiß. — Sporenketten gerade oder gewellt, als Seitenzweige an sterilen Lufthyphen (Abb. 1, d). — Keine Melaninbildung.

18. *Streptomyces phaeochromogenes* (Conn) Waksman et Henrici [BERGEY VI, S. 943 (1948)].

Syn.: *Actinomyces phaeochromogenus* Conn [N. Y. State Agr. Exp. Sta. Tech. Bull. No. 60, 16 (1917)].

Untersuchte Kulturen: ATCC 3338 Stamm Waksman „Production of Tyrosinase“ (ETH 20197); CBS Stamm Waksman (ETH 14851); NRRL B-1266 (ETH 16838).

Sporen glatt. — Luftmycel weiß. — Sporenketten gerade oder gewellt, als Seitenzweige an sterilen Lufthyphen (Abb. 1, d). — Melaninbildung.

Die in der Literatur erwähnten Spiralen konnten wir bei keinem der 3 Stämme beobachten.

Bei PRIDHAM et al. (1958) sind Stämme dieses Namens in 3 verschiedenen Luftmycelgruppen (rot, grau und gelb), aber keine bei weiß aufgeführt. Es dürfte nötig sein, für diese Species einen Typus festzulegen.

### III. *Luftmycel cinnamoneus*

19. *Streptomyces netropsis* Finlay et Sobin (U.S. Pat. 2,586,762 19. 2. 1952).

Untersuchte Kultur: NRRL 2268 (ETH 15974), Typus.

Sporen glatt. — Luftmycel blaßkarmin-zimtbraun. — Sporenketten gerade oder gewellt, als einfache bis doppelte Quirle an sterilen Lufthyphen (Abb. 1, a). — Keine Melaninbildung.

Hierher gehört: *S. cinnamoneus* ATCC 11874 Stamm NRRL (ETH 13355).

20. *Streptomyces tendae* nov. spec.

Untersuchte Kulturen: ETH 11313 aus Erdprobe von Tende, Frankreich, Typus; ETH 14077 aus Erdprobe von Cipières, Frankreich.

Sporen glatt. — Luftmycel blaßkarmin-zimtbraun. — Sporenketten in offenen, ziemlich regelmäßigen Spiralen als Quirle an sterilen Lufthyphen (Abb. 1, c). — Keine Melaninbildung.



Synthetischer Agar: Wachstum dünn, schleierartig, hellgelb; Luftmycel fehlt, kein Pigment. — Synthetische Lösung: Sediment, Flocken blaßkarmin bis hellgelbrot; feine hellgelbrote Pellikel; Substrat schwach blaßkarmin. — Glucose-Agar: Wachstum runzelig, hellgelb bis bräunlichgelb; Substrat bräunlichgelb. — Glucose-Asparagin-Agar: Wachstum runzelig, hellgelb bis blaßkarmin; Luftmycel wollig, zimtbraun. — Calciummalat-Agar: Wie Glucose-Agar. — Gelatinestich (18° C): Oberflächenwachstum runzelig, hellgelb; Luftmycel spärlich; Substrat dunkelbraun; Verflüssigung 0,5 cm nach 21 Tagen. — Stärkeplatte: Wachstum dünn, schleierartig, weißgelb; Hydrolyse nach 4 Tagen 0,3 cm, nach 7 Tagen 0,4 cm. — Kartoffeln: Wachstum bräunlich pechschwarz, runzelig; Luftmycel staubig, kreideweiß. — Karotten: Wachstum spärlich, punktförmig, runzelig, hellgelb. — Lackmusmilch: Ringwachstum und Pellikel bräunlichgelb bis gelblich rostbraun; Luftmycel spärlich; keine Koagulation; Peptonisierung schwach; Lackmus rötlich.

Beide Stämme produzieren das Antibioticum Carbomycin.

21. *Streptomyces venezuelae* Ehrlich et al. [J. Bact. 56, 467 (1948)].

Untersuchte Kulturen: CBS Stamm ATCC (ETH 10210), Typus (?); ETH 8948 eigene Isolierung; ETH 14630 eigene Isolierung.

Sporen glatt. — Luftmycel blaßkarmin-zimtbraun. — Sporenketten monopodial verzweigt, auffallend steif und gerade (Abb. 1, p). — Melaninbildung.

22. *Streptomyces lavendulae* (Waksman et Curtis) Waksman et Henrici [BERGEY VI, S. 944 (1948)].

Syn.: *Actinomyces lavendulae* Waksman et Curtis [Soil Sci. 1, 126 (1916)].

Untersuchte Kulturen: Streptothricin-Stamm von Prof. WAKSMAN, erhalten 1945 (ETH 4288), Typus (?); ETH 6569 eigene Isolierung; ETH 9910 eigene Isolierung; ETH 14501 eigene Isolierung.

Sporen glatt. — Luftmycel blaßkarmin-zimtbraun. — Sporenketten monopodial verzweigt; kurze offene, unregelmäßige Spiralen erst an den Enden langer, gerader Stücke (Abb. 1, f). — Melaninbildung.

Hierher gehören: *S. acidomyceticus* ATCC 11611 Stamm K. Sato, IFO, No. 3125 (ETH 16699). — *S. virginiae* NRRL B-1446 (ETH 14322). — *S. virginiae* CBS Stamm de Vries (ETH 20730).

23. *Streptomyces violaceoniger* (Waksman et Curtis) Waksman et Henrici [BERGEY VI, S. 947 (1945)].

Syn.: *Actinomyces violaceus-niger* Waksman et Curtis [Soil Sci. 1, 111 (1916)].

Untersuchte Kultur: NRRL B-1476 (ETH 14321).

Sporen glatt. — Luftmycel blaßkarmin-zimtbraun. — Sporenketten in engen, geschlossenen Spiralen; monopodial verzweigt (Abb. 1, n). — Keine Melaninbildung.

Hierher gehören: *S. hygroscopicus* ATCC 10976 Stamm Waksman No. 3951 (ETH 13081). — *S. hygroscopicus* NRRL B-1503, Stamm Osaka (ETH 15973).

Die 3 aufgeführten Stämme zeigen mit dem Alter eine schwarze Verflüssigung des Luftmycels, wie sie als Artmerkmal für *S. hygroscopicus*

gilt. Die gleiche Erscheinung zeigen aber auch die Stämme mit aschgrauem Luftmycel [vgl. *S. hygroscopicus* (31)].

24. *Streptomyces fradiae* (Waksman et Curtis) Waksman et Henrici [BERGEY VI, S. 954 (1948)].

Syn.: *Actinomyces fradii* Waksman et Curtis [Soil Sci. 1, 125 (1916)].

Untersuchte Kultur: ATCC 10745 Stamm Waksman No. 3535 (ETH 13472).

PRIDHAM et al. (1958, S. 64) haben vorgeschlagen, auf diesen Stamm als Typus und nicht auf die zum Teil mit ihm unvereinbaren Diagnosen abzustellen. Wir folgen ihrem Vorgehen.

CBS Stamm Bucherer (ETH 20737); NRRL B-1195 (ETH 13363).

Sporen glatt. — Luftmycel dunkelrot-zimtbraun-bräunlichgrau. — Sporenketten in offenen, regelmäßigen Spiralen von meist mehr als 5 Windungen; monopodial verzweigt, mit langer, gerader Hauptachse (Abb. 1, k). — Keine Melaninbildung.

Hierher gehören: *S. coelicolor* ATCC 3355 Stamm Waksman *A. violaceus-ruber* (ETH 9447). — *S. coelicolor* ATCC 10147 Stamm Waksman *A. coelicolor* No. 3034 (ETH 9448). — *S. coelicolor* Stamm Tonolo (ETH 9880); andere *S. coelicolor* siehe *S. griseus* (13). — *S. filipinensis* CBS Stamm Gottlieb (ETH 20722), Typus (?). — *S. flavogriseus* CBS Stamm CBS (ETH 16829). — *S. rochei* ATCC 10739 Stamm Aeschlimann (ETH 13471 u. ETH 20727), Typus (?). — *A. tyrosinaticus* CBS Stamm Beijerinck (ETH 16828). — *A. violaceus* CBS Stamm Ciferri (ETH 20721).

25. *Streptomyces erythraeus* (Waksman) Waksman et Henrici [BERGEY VI, S. 938 (1948)].

Syn.: *Actinomyces erythreus* Waksman [BERGEY I, S. 370 (1923)].

Untersuchte Kulturen: CBS Stamm Waksman u. Curtis (ETH 9521), Typus (?); CBS Stamm Duché (ETH 9520); ATCC 11635 Stamm McGuire (ETH 14307).

Sporen glatt. — Luftmycel blaßkarmin-zimtbraun. — Sporenketten monopodial verzweigt, auf der ganzen Länge in unregelmäßigen, offenen Spiralen (Abb. 1, m). — Keine Melaninbildung.

Hierher gehören: *S. rimosus* CBS Stamm NRRL 2234 (ETH 20240), Typus (?). — *S. roseochromogenes* CBS Stamm Bucherer (ETH 5526). — *S. roseochromogenes* CBS Stamm Duché (ETH 9527).

#### IV. *Luftmycel cinereus*

26. *Streptomyces reticuli* (Waksman et Curtis) Waksman et Henrici [BERGEY VI, S. 944 (1948)].

Syn.: *Actinomyces reticuli* Waksman et Curtis [Soil Sci. 1, 118 (1916)].

Untersuchte Kulturen: CBS Stamm Waksman u. Curtis (ETH 9873), Typus (?); NRRL B-1253 (ETH 14319).

Sporen glatt. — Luftmycel aschgrau. — Sporenketten gerade, in einfachen bis doppelten Quirlen an sterilen Lufthyphen (Abb. 1, a). — Keine Melaninbildung.

Entgegen den Diagnosen (l. c.) zeigte keiner der beiden Stämme Spiralen.

27. *Streptomyces viridogenes* Waksman (WAKSMAN and LECHEVALIER, Actinomycetes and their Antibiotics, Baltimore 1953, S. 109).

Syn.: *Actinomyces viridis* Millard et Burr [Ann. appl. Biol. **13**, 601 (1926)]. — non *A. viridis* Sanfelice. — nec *A. viridis* Duché.

Untersuchte Kultur: *S. viridis* ATCC 3372 Stamm Waksman (ETH 12397), Typus (?).

Sporen glatt. — Luftmycel aschgrau. — Sporenketten gerade oder gewellt, sympodial verzweigt, in Bäumchen mit langer Hauptachse (Abb. 1, o). — Keine Melaninbildung.

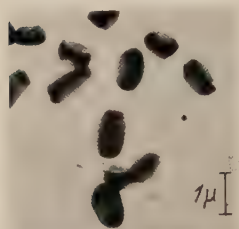


Abb. 11. Sporen von  
*S. ramulosus*, ETH 17653

28. *Streptomyces ramulosus* Ettlinger et al. [Helv. Chim. Acta **41**, 216 (1958)].

Untersuchte Kultur: ETH 17653 eigene Isolierung, Typus.

Sporen glatt (Abb. 11). — Luftmycel aschgrau. — Sporenketten an sterilen Lufthyphen, mehrfach monopodial verzweigt, Seitenzweige jeweils fast senkrecht ansetzend, gerade oder schwach gebogen, meist kurz und aus weniger als 8 Sporen bestehend (Abb. 1, h). — Keine Melaninbildung.

29. *Streptomyces olivaceus* (Waksman) Waksman et Henrici [BERGEY VI, S. 950 (1948)].

Syn.: *Actinomyces olivaceus* Waksman [BERGEY I, S. 354 (1923)].

Untersuchte Kulturen: CBS Stamm Waksman (ETH 9868), Typus (?); ATCC 3335 Stamm Waksman (ETH 14308), Typus (?); NRRL B-1125 (ATCC 11626, ETH 14309 u. ETH 14316).

Sporen glatt. — Luftmycel aschgrau. — Sporenketten monopodial verzweigt, gerade oder gewellt (Abb. 1, l). — Keine Melaninbildung.

Hierher gehören: *S. felleus* NRRL 2251 (ETH 14324), Typus (?). — *S. flavus* ATCC 3369 Stamm Waksman (ETH 13077), Typus (?). — *S. griseolus* CBS Stamm Waksman (ETH 10204), Typus (?). — *S. halstedii* ATCC 10897 Stamm Waksman 3328 (ETH 13080), Typus (?). — *S. halstedii* CBS Stamm Duché (ETH 9870). — *S. halstedii* NRRL B-1238 (ETH 15972). — *S. narbonensis* ETH 7346, Typus. — *S. scabies* CBS Stamm Butler (ETH 9309). — *S. verne* CBS Stamm Waksman u. Curtis (ETH 9874).

Es sei erwähnt, daß 4 der aufgeführten Species, nämlich *S. flavus* (KRAINSKY 1914), *S. halstedii* (WAKSMAN et CURTIS 1916), *S. scabies* (THAXTER 1891) und *S. verne* (WAKSMAN et CURTIS 1916), Priorität vor *S. olivaceus* besitzen. Die geprüften Stämme zeigen aber alle gewisse Abweichungen von den Diagnosen, die wir nicht übersehen dürfen, wenn wir nicht ganz sicher sind, die Typus-Kulturen zu besitzen. Es handelt sich um folgende Unstimmigkeiten: Bei *S. flavus* deuten die



Diagnosen eher auf *Luftmycel griseus* als auf *cinereus* hin; die für *S. halstedii* angegebenen Spiralen zeigte keiner der 3 Stämme; von *S. scabies* besitzen wir auch Sammlungsstämme mit *Luftmycel griseus* [(vgl. *S. griseus* (13)], aber weder diese noch der hier aufgeführte Stamm zeigen positive Tyrosinase-reaktion, wie sie für die Species verlangt wird; bei *S. verne* wird Fehlen des *Luftmycels* angegeben, was für ATCC 3353 Stamm Waksman (ETH 14312) auch tatsächlich zutrifft, nicht aber für den hier erwähnten Stamm.

30. *Streptomyces antibioticus* (Waksman et Woodruff) Waksman et Henrici [BERGEY VI, S. 942 (1948)].

Syn.: *Actinomyces antibioticus* Waksman et Woodruff [J. Bact. **42**, 232 (1941)].

Untersuchte Kulturen: CBS Stamm Waksman 3435 (ETH 9875 u. ETH 13491), Typus; ATCC 8663 Stamm Waksman 3435 (ETH 13353), Typus; ATCC 10382 Stamm NRRL B-546 (ETH 13354); Stamm Giolitti (ETH 14853).

Sporen glatt. — *Luftmycel* aschgrau. — Sporenketten monopodial verzweigt, gerade oder gewellt (Abb. 1, l). — Melaninbildung.

Hierher gehören: *S. bikiniensis* ATCC 11062 Stamm Waksman 3514 (ETH 14303); ebenso CBS (ETH 21195), Typus. — *S. cinereoruber* ETH 7451, Typus. — *S. cinereoruber* var. *fructofermentans* ETH 6143, Typus. — *S. eurythermus* ETH 6677, Typus; dazu ETH 6905, ETH 7489. — *S. ipomoeae* ATCC 11747 (Herkunft?) (ETH 16704).

*S. ipomoeae* (PERSON et MARTIN 1940) wäre älter als *S. antibioticus*, soll aber nach der Diagnose bläulich-grünes *Luftmycel* besitzen, was unser Stamm nicht aufweist.

31. *Streptomyces hygroscopicus* (Jensen) Waksman et Henrici [BERGEY VI, S. 953 (1948)].

Syn.: *Actinomyces hygroscopicus* Jensen [Proc. Linn. Soc. New South Wales **56**, 257 (1931)].

Untersuchte Kultur: CBS Stamm de Vries (ETH 17383).

Sporen glatt. — *Luftmycel* aschgrau. — Sporenketten mit engen, geschlossenen Spiralen; monopodial verzweigt (Abb. 1, n). — Keine Melaninbildung.

Hierher gehören: *S. platensis* CBS Stamm NRRL (ETH 20739), Typus (?). — *S. rutgersensis* var. *castelarensis* CBS Stamm Cercos (ETH 20732), Typus (?).

Ob diese Stämme oder diejenigen mit *Luftmycel cinnamoneus* [vgl. *S. violaceoniger* (23)] der von JENSEN aufgestellten Art entsprechen, ließe sich nur an Hand von authentischem Material schlüssig aufklären.

32. *Streptomyces aureofaciens* Duggar [Ann. N. Y. Acad. Sci. **51**, 177 (1948)].

Untersuchte Kulturen: ATCC 10762 Stamm NRRL 2209 (ETH 14302), Typus; CBS Stamm NRRL (ETH 17381), Typus; ETH 13387 eigene Isolierung.

Sporen glatt. — Luftmycel aschgrau. — Sporenketten monopodial verzweigt, auf der ganzen Länge in unregelmäßigen, offenen Spiralen (Abb. 1, m). — Keine Melaninbildung.

Hierher gehört: *S. ambofaciens* ETH 8703, der mit anderen eigenen Isolierungen zusammen durch das CBS so identifiziert wurde.

33.—*Streptomyces parvulus* Waksman et Gregory [Antibiot. and Chemother. 4, 1050 (1954)].

Untersuchte Kultur: Stamm Waksman 3677 (ATCC 12430, ETH 12648); (NRRL B-1628, ETH 14318), Typus.

Sporen glatt. — Luftmycel aschgrau. — Sporenketten monopodial verzweigt mit kurzer, gerader Hauptachse und offenen, regelmäßigen, meist langen Spiralen (Abb. 1, g). — Keine Melaninbildung.

34. *Streptomyces galilaeus* nov. spec.

Untersuchte Kultur: ETH 18822 aus Erdprobe unbekannter Herkunft, Typus.

Sporen glatt. — Luftmycel aschgrau. — Sporenketten monopodial verzweigt mit langer, gerader Hauptachse; offene, regelmäßige Spiralen (Abb. 1, k). — Melaninbildung.

Synthetischer Agar: Wachstum punktförmig, schleierartig, anfangs blaßkarmin, nach 10 Tagen hellgelbrot bis karminrot; Luftmycel samtig, weißgrau; Substrat unverfärbt. — Synthetische Lösung: Sediment, wenig Flocken, feine Trübung; Flocken blaßkarmin; Substrat blaßkarmin. — Glucose-Agar: Wachstum anfangs punktförmig, später pustelig, hellgelb bis blaßkarmin; Luftmycel spärlich, weißgrau; Substrat hellbraun. — Glucose-Asparagin-Agar: Wachstum pustelig bis dünn, schleierartig, anfangs weißgelb, später nach 7 Tagen zinnroterrot; Luftmycel samtig, aschgrau; kein lösliches Pigment. — Calciummalat-Agar: Wie Glucose-Asparagin-Agar; Luftmycel gut ausgebildet, samtig, aschgrau. — Gelatinestich (18° C): Oberflächenwachstum pustelig, hellgelbrot bis hellbraun; Luftmycel spärlich, mehl-grauweiß; Substrat rötlich-braun bis dunkelbraun; Verflüssigung nach 21 Tagen Spur. — Stärkeplatte: Wachstum punktförmig, karminrot; Luftmycel spärlich, weißgrau; Hydrolyse 0,2 cm nach 7 Tagen. — Kartoffeln: Wachstum pustelig bis flechtenartig, bräunlich-gelb; Luftmycel samtig, aschgrau; Substrat wenig verfärbt bis kastanienbraun. — Karotten: Wachstum spärlich, punktförmig, hellgelbrot. — Lackmusmilch: Wachstum gut; Pellikel dick, hellbraun; Luftmycel samtig, aschgrau; keine Peptonisierung und nur schwache Gerinnung nach 7 Tagen; Lackmus entfärbt.

Zeigt antibiotische Aktivität.

C. Luftmycel fehlend oder spärlich, so daß keine Einordnung möglich

*S. alboflavus* CBS Stamm Waksman u. Curtis (ETH 17382). — *S. annulatus* ATCC 3307 Stamm Waksman (ETH 13075). — *S. baarnensis* CBS Stamm Duché (ETH 20729). — *S. bobilliae* ATCC 3310 Stamm Waksman (ETH 9446). — *S. bobilliae* CBS Stamm Waksman (ETH 9308). — *S. cacaoi* ATCC 3082 Stamm Waksman (ETH 14304). — *S. cacaoi* CBS Stamm NCTC (ETH 9877). — *S. carneus*

ATCC 6847 Stamm NCTC 3527 (ETH 12396). — *A. clavifer* CBS Stamm Millard (ETH 16826). — *A. coeruleus* CBS Stamm Ciferri (ETH 21194). — *A. craterifer* CBS Stamm Millard (ETH 18060). — *S. diastaticus* CBS Stamm Waksman u. Curtis (ETH 9878). — *S. diastaticus* NRRL B-1270 (ETH 16837). — *S. fimicarius* CBS Stamm Duché (ETH 9530). — *S. flaveolus* CBS Stamm Waksman u. Curtis (ETH 12649). — *S. flaveolus* CBS Stamm Duché (ETH 12650). — *S. flavovirens* CBS Stamm Waksman (ETH 10248). — *S. flocculus* CBS Stamm CBS (ETH 20723). — *S. galtieri* CBS Stamm Goret (ETH 20728). — *S. gedanensis* ATCC 4880 Stamm Scudder 24400 (ETH 16701). — *S. gelaticus* CBS Stamm Waksman u. Curtis (ETH 10211). — *S. gelaticus* ATCC 3323 Stamm Waksman (ETH 16702). — *S. gibsonii* ATCC 6852 Stamm NCTC 4575 (ETH 16703). — *S. gougerotii* CBS Stamm Duché (ETH 10213). — *S. intermedius* ATCC 3329 Stamm Waksman (ETH 16705). — *A. nigrificans* CBS Stamm Wollenweber (ETH 16830). — *A. novae-caesareae* CBS Stamm Waksman u. Curtis (ETH 20738). — *S. rutgersensis* CBS Stamm Waksman u. Curtis (ETH 17541). — *A. somaliensis* CBS Stamm Ciferri (ETH 14850). — *S. verne* ATCC 3353 Stamm Waksman (ETH 14312). — *S. virido-flavus* NRRL B-1569 (ETH 14323).

### Zusammenfassung

Es wird eine Arteinteilung der Gattung *Streptomyces* vorgeschlagen, welche nur zwingende Merkmale verwendet und die variablen oder nicht eindeutig zu bestimmenden beiseite läßt. Als artdifferenzierend gelten die Morphologie der Sporen, Farbe und Morphologie des Luftmycels sowie die Chromogenität.

152 Sammlungsstämme mit 103 Speciesbezeichnungen sowie zahlreiche eigene Isolierungen wurden nach den genannten 4 Kriterien untersucht. 31 Sammlungsstämme von 26 Species konnten in Ermangelung von Luftmycel nicht bestimmt werden. Die restlichen Kulturen lassen sich in 34 verschiedene Arten einteilen, von denen 8 als neu beschrieben werden.

Die elektromikroskopischen Aufnahmen wurden im Laboratorium für Elektronenmikroskopie, Institut für allgemeine Botanik und Pflanzenphysiologie der E.T.H., Zürich, hergestellt; wir danken Herrn Prof. Dr. K. MÜHLETHALER und seinem Assistenten, Herrn H. MOOR, für die Hilfe. Herrn Prof. Dr. S. A. WAKSMAN, Rutgers University, und den Herren Dr. C. W. HESSELTINE und Dr. Th. G. PRIDHAM, beide im Northern Regional Research and Development Division Peoria, möchten wir für die Kulturen danken, die sie uns überlassen haben. Ferner danken wir Fräulein BRIGITT FELZMANN und Herrn ROLF BOSSI für die wertvolle Hilfe beim Bestimmen der Actinomyceten.

### Literatur

BACKUS, E. J., B. M. DUGGAR and T. H. CAMPBELL: Ann. N. Y. Acad. Sci. **60**, 86 (1954). — BALDACCI, E., G. F. COMASCHI, T. SCOTTI and C. SPALLA: VI<sup>o</sup> Congr. internaz. Microbiol., Roma. Symp. Actinomycetales, 20 (1953). — BALDACCI, E., P. BALDUZZI and A. M. AMICI: Bull. Res. Council of Israel **5D** (4), 263 (1957). — BALDACCI, E., E. GILARDI and A. M. AMICI: G. Microbiol. **6**, 512 (1956). — BALDACCI, E., and A. GREIN: G. Microbiol. **1**, 28 (1955). — BALDACCI, E., C. SPALLA and A. GREIN: Arch. Mikrobiol. **20**, 347 (1954a). — Ann. Microbiol. **6** (1/2), 41 (1954b). —



BERGEYS Manual of determinative Bacteriology: 1st ed. 1923, 4th ed. 1934, 6th ed. 1948, 7th ed. Baltimore: The Williams & Wilkins Company, 1957. — BURKHOLDER, P. R., S. H. SUN, J. EHRLICH and L. E. ANDERSON: Ann. N. Y. Acad. Sci. **60**, 102 (1954). — BURKHOLDER, P. R., S. H. SUN, L. E. ANDERSON and J. EHRLICH: Bull. Torrey Bot. Club **82**, 108 (1955).

CORBAZ, R., L. ETTLINGER, W. KELLER-SCHIERLEIN u. H. ZÄHNER: Arch. Mikrobiol. **25**, 325 (1957a); **26**, 192 (1957b).

DUGGAR, B. M., E. J. BACKUS and T. H. CAMPBELL: Ann. N. Y. Acad. Sci. **60**, 71 (1954).

ENGHUSEN, H.: Arch. Mikrobiol. **21**, 329 (1955).

FLAIG, W.: Z. Pflanzenernährg. **56**, 63 (1952). — FLAIG, W., H. BEUTELSPACHER, E. KÜSTER u. G. SEGLER-HOLZWEISSIG: Plant and Soil **4** (2), 118 (1952). — FLAIG, W., H. BEUTELSPACHER, I. SCHLICHTING-BAUER, W. POLITT-RUNGE u. R. KURZ: Zbl. Bakt. II. Abt. **108** (13/16), 376 (1955). — FLAIG, W., u. H. J. KUTZNER: Naturwissenschaften **41** (12), 287 (1954).

GAUSE, G. F.: Problems of the classification of the antagonistic *Actinomyces* species. Inst. of Antib. Moscow: Academy of Medical Sciences 1957.

HESELDTINE, C. W., R. G. BENEDICT and T. G. PRIDHAM: Ann. N. Y. Acad. Sci. **60**, 136 (1954).

KRAINSKY, A.: Zbl. Bakt. II. Abt. **41**, 649 (1914). — KRASSILNIKOV, N. A.: Guide to the identification of bacteria and actinomycetes. Moscow: Academy of Sciences, USSR 1949. — KÜSTER, E.: Atti VI° Congr. internaz. Microbiol. **1**, 114 (1953). — KUTZNER, H. J.: Beitrag zur Systematik und Ökologie der Gattung *Streptomyces* Waksman et Henrici. Dissertation Hohenheim (1956).

LINDENBEIN, W.: Arch. Mikrobiol. **17**, 361 (1952).

OKAMI, Y.: G. Microbiol. **2**, 63 (1956).

PRIDHAM, T. G., C. W. HESSELDTINE and R. G. BENEDICT: Appl. Microbiol. **6** (1), 62 (1958).

THAXTER, R.: 15th Ann. Rpt. Conn. Agr. Exp. Sta. 153 (1891).

VERNON, T. R.: Nature (Lond.) **176** (4489) 935 (1955).

WAKSMAN, S. A.: Bact. Rev. **21** (1), 1 (1957). — WAKSMAN, S. A., and R. E. CURTIS: Soil Sci. **1**, 99 (1916). — WAKSMAN, S. A., and F. J. GREGORY: Antibiot. and Chemother. **4** (10), 1050 (1954). — WAKSMAN, S. A., and H. A. LECHEVALIER: Actinomycetes and their Antibiotics. Baltimore 1953. — WELSCH, M., R. CORBAZ and L. ETTLINGER: Schweiz. Z. allg. Path. **20** (4), 454 (1957).

YAMAGUCHI, T., and Y. SABURI: J. gen. Appl. Microbiol. **1** (3), 201 (1955).

ZÄHNER, H., u. L. ETTLINGER: Arch. Mikrobiol. **26**, 307 (1957).

(Aus dem Institut für Gärungswissenschaft und Enzymchemie der Universität Köln)

## Zur Kenntnis des Fettsäureabbaus durch Schimmelpilze

II. Mitteilung

### Über Fettsäuredehydrasen aus Schimmelpilzen

Von

WILHELM FRANKE und WOLFGANG HEINEN

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 16. April 1958)

Über Fettsäuredehydrasen in Schimmelpilzen ist kaum etwas bekannt. MUKHERJEE (1951) gibt Methylenblaureduktion durch Fettsäuren bis  $C_{10}$  in Gegenwart von Mycelsuspensionen, nicht aber von Mycelextrakten verschiedener Aspergillaceen (*Asp. niger*, *Asp. flavoryzae*, *Pen. glaucum*) an. Dagegen sollen Extrakte mit den Fettsäuren von  $C_4$  bis  $C_{14}$  Sauerstoff aufnehmen, um so weniger, je länger die Fettsäurekette ist; Palmitin- und Stearinsäure bleiben unangegriffen. Die Farbstoffversuche MUKHERJEEs sind problematisch, da keine Kontrollwerte für fettsäurefreie Ansätze angegeben wurden; die Sauerstoffversuche enthalten noch keinen exakten Dehydrasenachweis. Letzteres gilt auch für neuere aerobe Versuche mit Mycelsuspensionen von *Pen. roqueforti* (GIROLAMI u. KNIGHT 1955). Nur die Fettsäuren zwischen  $C_4$  und  $C_{12}$  erhöhen den Sauerstoffverbrauch der ruhenden Zellen erheblich; das Maximum liegt bei  $C_9$ . Als Reaktionsprodukte wurden in kleiner Menge die entsprechenden Methylketone (vgl. I. Mitt. von FRANKE u. HEINEN 1958a) gefaßt.

Da die vorliegenden aeroben Befunde zusammen mit dem Methylketonnachweis die Existenz von Fettsäuredehydrasen in Schimmelpilzen zwar wahrscheinlich machten, aber sie nicht bewiesen, sollte deren exakter Nachweis in Pilzextrakten die Aufgabe der nachstehenden Untersuchung sein.

### Methodik

#### 1. Pilzmaterial und -züchtung

Es kamen die bereits in der I. Mitteilung verwendeten Pilzarten zur Untersuchung, dazu einige weitere Aspergillaceen (z. B. *Asp. glaucus*, *Asp. clavatus*, *Asp. terreus*, *Pen. brevicaulis*, *Pen. candidum*, *Pen. glabrum*, *Pen. notatum*, *Pen. chrysogenum*), die aber wegen ihres Nichtangehens auf Nährlösungen mit Fettsäuren als einziger C-Quelle später nicht mehr weiter beachtet wurden.

Als Grundnährlösung diene wieder die folgende:

0,5% Ammonsulfat	0,1% Magnesiumsulfat (krist.)
0,5% prim. Kaliumphosphat	Spur Ferrichlorid
0,1% Calciumnitrat (krist.)	Spur Zinksulfat,

meist unter Zusatz von 2% Glucose. Weitere Zusätze sollten die *adaptive* Fettsäuredehydrase-Bildung (vgl. z. B. KARSTRÖM 1938) fördern. Als solche Zusätze wurden verwendet: a) 0,3% Fettsäure (mit  $\text{NH}_3$  neutralisiert); b) 0,3% Tween 20, 40, 60 oder 80<sup>1</sup>; c) 0,3% Fettsäure (neutralisiert) + 0,3% Tween. Zur Züchtung von Mycelmaterial für die Enzymgewinnung diene später am häufigsten der Zusatz von 0,3% Tween 20 bzw. 40 oder von 0,3% Palmitat + 0,3% Tween 40 (vgl. Tab. 1, S. 365).

Für die präparative Mycelzüchtung wurden die Nährlösungen im allgemeinen mit einer im Mörser zerriebenen, sporulierenden Vorkultur auf fettsäurehaltiger Nährlösung beimpft. Nach 2—4tägiger Züchtung in großen Petrischalen (20—25 cm  $\varnothing$ ) bei 28° C wurden die Myceldecken zwecks Verarmung an Eigensubstraten eine Nacht auf Leitungswasser gesetzt und anschließend in der hydraulischen Presse abgepreßt.

## 2. Herstellung von Enzymlösungen

Es wurde im wesentlichen nach früheren Angaben (FRANKE, TAHA u. KRIEG 1952, FRANKE u. SCHULZ 1956) verfahren und das mit Seesand zerriebene Preßmycel mit der 2,5fachen Menge  $\text{m}/10\text{-Na}_2\text{HPO}_4$  extrahiert. Die (meist 15 min bei 5000 g) zentrifugierte, aber noch getrübbte Enzymlösung wurde in Eiswasser aufbewahrt. Trockengewichtsbestimmungen erfolgten bei 110° C nach 48stündiger Dialyse gegen fließendes Leitungswasser.

In verschiedenen Fällen wurden Enzymlösungen vor ihrer Prüfung im Cellophanschlauch von 2,2 cm  $\varnothing$  2—6 Std gegen dest. Wasser bei 5° C dialysiert („Normaldialyse“). Durch Eintauchen eines mit Wasser gefüllten Reagensglases (1,6 cm  $\varnothing$ ) oder eines dicken Glasstabes von ähnlichem Durchmesser konnte die dialysierende Oberfläche auf etwa das Doppelte erhöht und die Dialyse dadurch wirksamer gestaltet werden („Intensivdialyse“).

## 3. Aktivitätsmessungen

Die Fettsäuredehydrase-Wirkung wurde nach der Thunberg-Methodik bei 30° untersucht, gewöhnlich mit dem Indaminfarbstoff *Bindshedlers*

<sup>1</sup> Die (in der Praxis hauptsächlich als Emulgatoren verwendeten) *Tweens* sind Polyoxyäthylenderivate der Sorbitanester von höheren Fettsäuren. Tween 20 enthält Laurinsäure, Tween 40 Palmitinsäure, Tween 60 Stearinsäure, Tween 80 Ölsäure (vgl. RÖMPP 1958).



Grün als H-Acceptor. Der „Normalansatz“ hatte folgende Zusammensetzung:

1,0 ml Enzymlösung	0,5 ml m/1000-Farbstofflösung
0,5 ml m/20-Fettsäurelösung (K-Salz)	1,5 ml m/5-Puffer (meist $p_H$ 7,1) H <sub>2</sub> O auf 5 ml.

Soweit Konzentrationen an Enzym oder Substrat oder das  $p_H$  variiert wurden, ist dies im Text jeweils vermerkt.

Neben den Entfärbungszeiten (stets in Minuten) des vollständigen Ansatzes ( $t$ ) und des substratfreien ( $t_0$ ) wird im folgenden meist noch die *Dehydrierungsintensität*

$$I = 100 (1/t - 1/t_0)$$

und die *spezifische Dehydrierungsintensität*

$$I_0 = I/\text{mg Enzymtrockengew.}$$

angegeben. Bisweilen ist unter der Rubrik  $\%I_0$  die prozentische Aktivität, bezogen auf  $I_0$  des Rohextrakts, verzeichnet.

#### 4. Präparate

Die Fettsäure-Präparate waren die in der I. Mitteilung verwendeten. Von hinzukommenden Cofaktoren<sup>1</sup> waren DPN-75 und DPN-95 sowie SH-Glutathion von der Fa. Boehringer u. Söhne, Mannheim, TPN rein von der Sigma Chemical Comp., St. Louis, ATP von der Zellstoff-fabrik Mannheim-Waldhof, CoA von Boehringer Sohn, Ingelheim<sup>2</sup>. Der tatsächliche Gehalt der beiden DPN-Präparate, mit krist. Alkoholdehydrase bestimmt (vgl. Boehringer & Söhne 1955), war 68 bzw. 86%, derjenige des ATP, aus Gesamtphosphat und 7 min-Phosphat (HINSBERG-LANG 1951) bestimmt, war 48%, derjenige des CoA, nach LYNEN (1951) bestimmt, war 68%. Spätere Mengenangaben beziehen sich auf Reinpräparate.

#### 5. Auswertung von Aktivierungseffekten

Bei Reaktivierungsversuchen an (durch Dialyse) zum Teil inaktivierten Enzymlösungen zeigte sich, daß bei Zugabe von Cofaktoren häufig eine erhebliche Verkürzung von  $t_0$  eintrat, eine Erscheinung, die auch in anderen Fällen, z. B. bei hohen Enzymkonzentrationen, zu beobachten war. Um zu ermitteln, ob ein bestimmter  $I_0$ -Wert durch die Verkürzung von  $t_0$  beeinflusst wird, wurde der Einfluß zugesetzter H-Donatoren (Glucose, Glutaminsäure, Äpfelsäure) auf  $t_0$  wie auch die Entfärbungszeit  $t$

<sup>1</sup> Nachstehende Abkürzungen werden hier und im folgenden gebraucht: DPN Diphosphopyridin-nucleotid, TPN Triphosphopyridin-nucleotid, ATP Adenosin-triphosphat, AMP Adenosinmonophosphat, PP Pyrophosphat, CoA oder CoA-SH Coenzym A, GSH SH-Glutathion.

<sup>2</sup> Für kostenlose Überlassung von 200 mg CoA sind wir Herrn Prof. Dr. K. ZELLE von der genannten Firma sehr verbunden.

mit *Palmitat* oder *Oleat* unter Verwendung *undialysierter* Extrakte untersucht. Dabei ergab sich, daß durch den H-Donatorzusatz „Scheinaktivierungen“ der Fettsäuredehydrierung bis zu 60% vorgetäuscht werden können, wenn  $t_0$  (63 min) bis auf ein  $\frac{1}{4}$  des Ausgangswerts absinkt. In Abb. 1 ist  $\%I_0$  gegen die Leerentfärbungszeit ( $t_0$  bzw.  $\%t_0$ ) bei verschiedenen Zusätzen aufgetragen. Da Palmitat- und Oleatdehydrierung sich hinsichtlich der proz.  $I_0$ -Werte innerhalb der Fehlergrenzen gleich verhielten, wurden in der Abbildung Mittelwerte für  $\%I_0$  eingetragen.

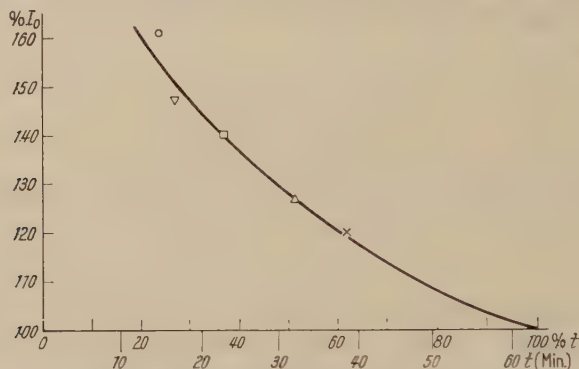


Abb. 1. Scheinbare Steigerung der Dehydrierungsintensität ( $\%I_0$ ) von Palmitat und Oleat (Mittelwerte) in Abhängigkeit von der Reduktion der Leerentfärbungszeit ( $t_0$  bzw.  $\%t_0$ ) bei *Asp. niger*-Extrakt). Zusätze: x m/50-Glutaminat, △ m/50-Glucose, □ m/50-Malat, ▽ m/30-Glutaminat, o m/30-Malat

Wie ersichtlich, liegen die zu verkürzten  $t_0$ -Werten gehörigen  $I_0$ -Werte auf einer ansteigenden, schwach gekrümmten Kurve. Auf diese Tatsache wird später zurückzukommen sein (S. 364 u. 373).

## Versuchsergebnisse

### 1. Auswahl der Nährlösungen und der Pilze

Es wurde zunächst versucht, durch Züchtung von über 50 Pilzstämmen auf der S.360 erwähnten Grundnährlösung mit den geradzahlgigen Fettsäuren von  $C_4$  bis  $C_{18}$  einschließlich Öl- und Linolsäure als einziger C-Quelle (jeweils 0,3%) die „lipophilsten“ Organismen auszusondern. Das Ergebnis war enttäuschend; häufig gingen die Pilze — nach Beimpfung der Nährlösung in Petrischalen mit den Sporen einer Stammkultur — überhaupt nicht an, in den günstigsten Fällen bildeten sich größere Mycelflocken oder unvollständige und rasch sporulierende Myceldecken. Höhere Fettsäuren ( $C_{12}$  und höher) schienen als C-Quellen geeigneter als niedrigere. Zu den noch am besten angehenden Pilzen gehörten *Rhizopus nigricans*, *Rhiz. tonkinensis*, *Mucor plumbeus*, *Asp. niger*, *Asp. fumigatus*, *Asp. sp.*, *Pen. roqueforti*, *Pen. camemberti* und *Botrytis cinerea*.

Da bei dem  $pH$  der Nährlösungen (6,2—6,6) zum wenigsten die höheren gesättigten Fettsäuren zum Teil ausgefallen waren, wurden in einer

zweiten Versuchsreihe den zuletzt erwähnten Pilzen die Fettsäuren in der leichter löslichen Form der *Tweens* 20, 40, 60 und 80 zugesetzt. FRIES u. YUSEF (1955) hatten bereits für den Ascomyceten *Ophiostoma multiannulatum* gezeigt, daß er Tweens als Baumaterial verwerten kann (gut allerdings nur in Gegenwart von Glucose). Der Tween-Zusatz in unseren Versuchen betrug 0,1<sup>0</sup>/<sub>0</sub>, da nach Vorversuchen eine Tween-Konzentration von 0,3<sup>0</sup>/<sub>0</sub> nicht von allen Pilzen vertragen wird. Die Ergebnisse mit der obigen Auswahl von 9 Pilzen waren merklich besser als bei der Züchtung auf fettsauren Salzen. Häufig bildeten sich nach 4 Tagen unvollständige, in einigen Fällen — *Rhiz. nigricans*, *Rhiz. tonkinensis*, *Asp. niger* — auch sehr dünne vollständige Myceldecken. Allerdings begannen die Pilze, besonders bei Tween 80, sehr bald zu sporulieren.

Jedenfalls war ersichtlich, daß mit Fettsäuren oder Tweens allein keine für die Enzymgewinnung ausreichenden Mycelmengen gewonnen werden konnten. In einer dritten orientierenden Versuchsreihe wurde daher den Nährlösungen entweder mit fettsauren Salzen oder mit Tweens noch jeweils 1<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Glucose zugesetzt. Eine Kontrollreihe mit 1<sup>0</sup>/<sub>0</sub> Glucose allein lief mit. Die Auswertung der 4-tägigen Wachstumsversuche mit den früher angeführten 9 Auswahlstämmen ergab, daß derartige kombinierte Nährlösungen in vielen Fällen durchaus brauchbar sind. Die Wachstumsintensität der Kontrollen wurde zwar in keinem Falle ganz erreicht; immerhin bildeten sich in einer größeren Zahl von Fällen nun vollständige, wenn auch meist etwas dünne Decken. Die Tween-Glucose-Kombination lieferte bessere Durchschnittsergebnisse als die Fettsäure-Glucose-Kombination; bei Tween 80 fiel wieder die rasche Sporulation auf.

## 2. Dehydrierungsversuche mit Mycelextrakten

Nachdem die Möglichkeiten zur Gewinnung ausreichender Mycelmengen bei gebotener Adaptation an Fettsäuren erprobt worden waren, wurden die ersten Acceptorversuche zum Nachweis von Fettsäuredehydrasen in Wasser- oder Phosphatextrakten gut gewachsenen Mycels durchgeführt, mit Bindschedlers Grün oder 2,6-Dichlorphenol-indophenol als Acceptor. Die Versuche verliefen zwar meist positiv, doch war die Leerreduktion der Extrakte gewöhnlich hoch (kurze  $t_0$ -Werte), die Aktivität auch bei den am besten dehydrierbaren höheren Fettsäuren gering und von Fall zu Fall sehr wechselnd. Es wurde daher die Abhängigkeit der Dehydrase-Aktivität von verschiedenen Faktoren, vor allem von der Zusammensetzung der Nährlösung, näher untersucht. Wir beschränkten uns dabei auf *Rhiz. tonkinensis* und *Asp. niger*, die (neben *Pen. camemberti*) in den vorausgegangenen Wachstumsversuchen den am stärksten lipophilen Charakter gezeigt hatten; als Substrate wurden zunächst nur *Palmitat* und *Oleat* verwendet.



a) *Einfluß der Nährlösung*

Als Basisversuch wurden die Pilze auf einer Grundnährlösung (S. 360) mit Zusatz von nunmehr 20% Zucker gezüchtet; das abgepreßte Mycel wurde mit m/10- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  extrahiert und die Aktivität des Extrakts in jeweils 1 ml bestimmt (Tab. 1, I). In der Versuchsserie II wurden außerdem 0,3% verschiedener fettsaurer Salze zugefügt, in Serie III 0,3% der verschiedenen Tweens und in der letzten Versuchsserie IV sowohl 0,3% Fettsäure ( $\text{C}_{18}$ ) als auch 0,3% Tween.

Das Ergebnis der mit m/200-Palmitat (nur teilweise gelöst) und m/200 Oleat (fast ganz gelöst) als Substraten und m/100000-Bindschedlers Grün als Acceptor durchgeführten Doppelreihe (*Rhiz. tonkinensis* und *Asp. niger*) zeigt Tab. 1.

Man erkennt aus der Tabelle, daß mit ganz wenigen Ausnahmen Palmitat und Oleat von den Extrakten beider Pilze mit vergleichbarer Geschwindigkeit angegriffen werden; im Mittel wird Palmitat etwas rascher dehydriert als Oleat. Zu den einzelnen Versuchsserien (I—IV) wäre folgendes zu bemerken:

I. Mäßige Dehydrase-Aktivität ( $I_0$ ) ist im Mycel auch in Abwesenheit von Fettsäure bei der Züchtung vorhanden; die Fettsäuredehydrasen sind also *konstitutive* Enzyme der Pilze (vgl. KARSTRÖM 1938). Das Verhältnis von Leer- und Substratentfärbungszeit ( $t_0/t$ ) ist aber relativ klein und daher ungünstig (2,6—2,8:1).

II. Bei Zusatz verschiedener fettsaurer Salze zur zuckerhaltigen Nährlösung wird  $t_0$  der Extrakte durchweg kleiner und der Quotient  $t_0/t$  verschlechtert sich noch (1,3—2,1:1).  $I_0$  ist in keinem Falle gegenüber Versuchsserie I erhöht, sondern zum Teil merklich erniedrigt. Von einer adaptiven Enzyymbildung ist unter diesen Züchtungsbedingungen nichts zu merken. Dabei ist noch zu berücksichtigen, daß nach früheren Ausführungen (S. 362) Verkürzung von  $t_0$  ceteris paribus *Erhöhung* von  $I_0$  bewirken sollte. Wahrscheinlich ist die Reduktion von  $t_0$  bei Verwendung fettsäurehaltiger Nährlösungen zum Teil darauf zurückzuführen, daß die Pilze teils zwischen, teils auch in den Hyphen Fettsäuren speichern, die dann auch in die Mycelextrakte gelangen. (Vgl. Beobachtungen von FLIEG 1922 an *Asp. niger*.)

III. Bessere Ergebnisse erhält man bei Züchtung in Tween-Gegenwart, wobei die Präparate 20 und 40 vorteilhafter als 60 und 80 sind. Die  $I_0$ -Werte sind im Vergleich zu Serie I und II teilweise beträchtlich erhöht (2—4fach), der Quotient  $t_0/t$  liegt bei Tween 20 und 40 bei 2,7—5,0:1.

IV. Die Kombination Fettsäure + Tween (20 oder 40) im Medium ist reiner Tween-Züchtung ungefähr gleichwertig, was die  $I_0$ -Werte und den Quotienten  $t_0/t$  (2,5—4,8:1) betrifft. Als ein besonderer Vorteil dieser

Züchtungsform erscheint der durchweg hohe  $t_0$ -Wert; nachteilig ist das langsamere Wachstum der Pilze auf diesen Nährlösungen, so daß sich die Mycelerte um etwa einen Tag gegenüber der reinen Tween-Züchtung verschiebt.

Bei den folgenden Versuchen wurde Mycel von *Asp. niger* (gelegentlich auch von *Rhiz. tonkinensis*), das nach Methode III (mit Tween 20 oder 40) oder nach Verfahren IV gewonnen worden war, verwendet.

Tabelle 1. Beeinflussung der Dehydrase-Aktivität von Extrakten aus *Rhiz. tonkinensis* und *Asp. niger* durch Zusatz von Fettsäuren (II), von Tweens (III) und von Fettsäuren + Tweens (IV) zu einer Grundnährlösung mit 2% Glucose

Zusätze	Substrat	<i>Rhiz. tonkinensis</i>					<i>Asp. niger</i>				
		Tr.- gew. <sup>1</sup>	$t_0$	$t$	$I$	$I_0$	Tr.- gew. <sup>1</sup>	$t_0$	$t$	$I$	$I_0$
I { keine	Palm.-S.	6,8	48	19	3,17	0,47	5,2	59	23	2,65	0,51
	Öl-S.			18	3,47	0,51			21	3,05	0,59
II {	0,3% Butyrat	Palm.-S.	8,4	30	14	3,80 0,45	7,3	26	13	3,95	0,54
		Öl-S.			14	3,80 0,45			14	3,40	0,47
	0,3% Caprinat	Palm.-S.	5,9	20	13	2,70 0,46	8,2	22	12	3,80	0,46
		Öl-S.			15	1,68 0,29			12	3,80	0,46
	0,3% Laurat	Palm.-S.	4,1	38	23	1,72 0,42	6,2	36	20	2,23	0,36
		Öl-S.			25	1,34 0,33			19	2,48	0,40
	0,3% Palmitat	Palm.-S.	6,1	27	15	3,00 0,49	5,9	32	17	2,78	0,47
		Öl-S.			16	2,60 0,43			18	2,43	0,41
	0,3% Oleat	Palm.-S.	5,4	45	28	1,35 0,25	6,8	20	13	2,70	0,40
		Öl-S.			30	1,10 0,21			12	3,75	0,49
III {	0,3% Tween 20	Palm.-S.	3,9	46	17	3,74 0,96	4,4	44	14	4,85	1,10
		Öl-S.			17	3,74 0,96			15	4,40	1,00
	0,3% Tween 40	Palm.-S.	7,2	30	6	13,30 1,84	5,9	32	7	11,20	1,90
		Öl-S.			9	7,80 1,08			10	6,70	1,14
	0,3% Tween 60	Palm.-S.	5,0	25	11	5,10 1,02	5,7	22	9	6,60	1,19
		Öl-S.			18	1,60 0,32			11	4,80	0,83
	0,3% Tween 80	Palm.-S.	3,2	50	36	0,77 0,24	3,3	23	14	2,80	0,86
		Öl-S.			42	0,38 0,12			16	1,90	0,58
VI {	0,3% Palmitat + 0,3% Tween 20	Palm.-S.	—	—	—	—	3,7	53	14	5,25	1,44
		Öl-S.							15	4,77	1,29
	0,3% Palmitat + 0,3% Tween 40	Palm.-S.	3,6	59	15	5,00 1,39	3,4	67	14	5,62	1,71
		Öl-S.			18	3,87 1,07			16	4,75	1,40
	0,3% Oleat + 0,3% Tween 40	Palm.-S.	3,3	53	21	2,86 0,87	4,3	46	12	6,14	1,42
		Öl-S.			20	3,11 0,94			12	6,14	1,42

<sup>1</sup> mg Trockengewicht der Enzymlösung/ml.

b) *Einfluß des Acceptors*

Ein Vergleich von Bindschedlers Grün mit anderen gebräuchlichen Acceptorfarbstoffen (vgl. FRANKE 1955) bewies eindeutig die Überlegenheit des Indaminfarbstoffs (Tab. 2) und bestätigte damit die Erfahrungen bei den Fettsäuredehydrasen der Samen (FRANKE u. FREHSE 1954) und der Leber (FRANKE, TASCHEN u. FREHSE 1956). Das von MUKHERJEE (1951) verwendete Methylenblau (S. 359) erwies sich als ein sehr schlechter Acceptor. Der Einfluß des Redoxpotentials (in Volt) ist in Tab. 2 unverkennbar.

Tabelle 2. *Dehydrierung von m/200-Palmitat durch verschiedene Acceptorfarbstoffe (m/10000) in Gegenwart von Asp. niger-Extrakt*  
Züchtung auf Nährlösung mit 2% Glucose und 0,3% Tween 40

Farbstoff	$E_o'$ (pH 7)	$t_o$	$t$	$I$	$I_o$
Bindschedlers Grün . . .	0,224	40	6	14,1	1,80
2,6-Dichlorphenol-indophenol . . . . .	0,217	64	18	4,0	0,56
Toluylenblau . . . . .	0,115	62	44	0,64	0,08
Thionin . . . . .	0,062	75	60	0,34	0,04
Methylenblau . . . . .	0,011	$\geq 300$	$> 300$	sehr klein	sehr klein

Nach diesen Ergebnissen wurde weiterhin nur mehr Bindschedlers Grün in der Konzentration m/10000 verwendet.

c) *Einfluß des Extraktionsmittels*

Tab.3 zeigt daß ein in üblicher Weise mit m/10-sec. Phosphat hergestellter Mycelextrakt rund 4mal wirksamer ist als ein Wasserextrakt des gleichen Mycels.

Tabelle 3. *Dehydrierung von m/200-Oleat durch zwei verschieden hergestellte Asp. niger-Extrakte*

Extraktionsmittel	Tr.-gew. mg	$t_o$	$t$	$I$	$I_o$
Wasser. . . . .	4,35	68	31	1,75	0,38
m/10-sec. Phosphat . . .	3,95	53	12	6,40	1,62

d) *Lokalisation der Fettsäuredehydrasen*

Es wurde die Aktivität eines wie üblich gewonnenen Phosphatextrakts aus *Asp. niger* (15 min bei 5000 g zentrifugiert) bestimmt und der Rest des Extrakts hierauf zur Entfernung der Mitochondrien 30 min in der Kühlzentrifuge bei  $-3^{\circ}\text{C}$  und 15000 g zentrifugiert. Der Aktivitätswert des Überstands stimmte innerhalb der Fehlergrenzen mit demjenigen des Rohextrakts überein (Tab.4).



Demnach sind die Pilz-Fettsäuredehydrasen in Rohextrakten nicht in den Mitochondrien lokalisiert, sondern entweder in den Mikrosomen (für deren Abscheidung das notwendige Schwerefeld von 100000 g nicht zur Verfügung stand) oder im Rest-Cytoplasma.

Tabelle 4. *Dehydrierung von Palmitat und Oleat durch nieder- und hochtourig zentrifugierten Asp. niger-Extrakt*

Enzymmaterial	Tr.-gew. mg	Substrat	$t_0$	$t$	$I$	$I_0$
Rohextrakt . . . . .	5,40	Palm.-S.	56	12	6,5	1,20
		Öl-S.		14	5,3	0,98
Überstand nach hoch- tourigem Zentri- fugieren (15000 g) . .	5,02	Palm.-S.	70	14	5,7	1,14
		Öl-S.		16	4,8	0,96

In *Pflanzensamen* kommen Fettsäuredehydrasen unterschiedlicher Eigenschaften teils in Mikrosomen (HUMPHREYS, NEWCOMB, BOKMAN u. STUMPF 1954, HUMPHREYS u. STUMPF 1955), teils in Mitochondrien (STUMPF u. BARBER 1956) vor.

### 3. Methylketonbildung und Fettsäuredehydrasen-Aktivität

Die Annahme lag nahe, daß gute Methylketonbildner einen intensiveren Fettsäureabbau besäßen als schlechte; möglicherweise war der erste Schritt, die Fettsäuredehydrierung, geschwindigkeitsbestimmend. Um dies zu klären, wurden nach den Befunden der I. Mitteilung sowohl 4 gute (Gruppe I) als 4 schlechte (bzw. negative) Methylketonbildner (Gruppe II) ausgewählt und auf ihre Dehydrierungsaktivität untersucht (Tab. 5). Um bei beiden Gruppen möglichst vergleichbare  $t_0$ -Werte zu erhalten (vgl. S. 361/62), mußten die Versuche an den guten Methylketonbildnern mit der Hälfte der sonst üblichen Enzymkonzentration durchgeführt werden.

Wie ersichtlich, sind Fettsäuredehydrasen in beiden Gruppen vorhanden; die Dehydrierungsintensität ist bei den schlechten Methylketonbildnern im Durchschnitt geringer, doch größenordnungsmäßig vergleichbar. Der Mittelwert von  $I_0$  ist

in Gruppe I für  $\left\{ \begin{array}{l} \text{Palmitat } 0,72 \\ \text{Oleat } 0,51 \end{array} \right\}$ , in Gruppe II für  $\left\{ \begin{array}{l} \text{Palmitat } 0,38 \\ \text{Oleat } 0,45 \end{array} \right\}$ .

Auf den Unterschied im Verhältnis Palmitat zu Oleat in beiden Gruppen möchten wir bei der geringen Zahl der untersuchten Pilzarten einstweilen kein größeres Gewicht legen; ob er für die Existenz zweier verschiedener Dehydrasen spricht, bedarf weiterer Untersuchung.

Tabelle 5. Palmitat- und Oleatdehydrierung durch Extrakte aus guten (I) und schlechten Methylketonbildnern (II)

Pilzart	Tr.-gew. mg	Substrat	$t_0$	$t$	$I$	$I_0$
I	4,55	Palm.-S.	100	20	4,0	0,88
		Öl.-S.		26	2,8	0,62
	3,65	Palm.-S.	96	21	3,75	1,02
		Öl.-S.		28	2,55	0,70
	3,12	Palm.-S.	106	32	2,22	0,75
		Öl.-S.		43	1,43	0,45
II	3,60	Palm.-S.	140	34	2,23	0,62
		Öl.-S.		41	1,73	0,48
	3,88	Palm.-S.	150	40	1,84	0,47
		Öl.-S.		38	2,12	0,55
	3,70	Palm.-S.	110	50	1,09	0,29
		Öl.-S.		44	1,36	0,37
	4,10	Palm.-S.	120	29	2,62	0,64
		Öl.-S.		25	3,13	0,78
	2,95	Palm.-S.	76	39	1,24	0,39
		Öl.-S.		47	0,90	0,31

## 4. Kinetik der Fettsäuredehydrase-Wirkung

## a) Einfluß der Enzymkonzentration

Von zwei Extrakten aus *Asp. niger* und aus *Rhiz. tonkinensis* mit fast gleichem Trockengewicht (8,7 bzw. 8,5 mg/ml) wurde die „Normal-

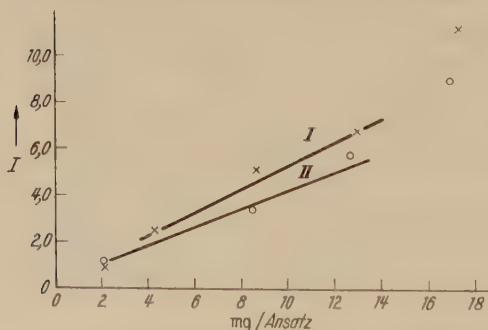


Abb. 2. Oleat-Dehydrierung durch Extrakte aus *Asp. niger* (I) und *Rhiz. tonkinensis* (II) in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration

ansätzen“ mit m/200-Oleat zugesetzte Menge zwischen 0,25 und 2,0 ml variiert. Abb. 2 zeigt die Abhängigkeit der Dehydrierungsintensität  $I$  von der Enzymkonzentration (in mg/Ansatz). Bis zu etwa 13 mg (= 1,5 ml) besteht eine lineare Beziehung.

Daß die  $I$ -Werte für die höchste Enzymkonzentration (2,0 ml) etwa 20% zu hoch liegen, rührt sicher vom ungewöhnlich starken Anstieg der  $t_0$ -Werte in diesem Bereich her (vgl. S. 362); so ergab sich bei *Asp. niger*

	$t_0$	$t$	$I$		$t_0$	$t$	$I$
für 1,5 ml	31	10	6,8	für 2,0 ml	18	6	11,1

Für Aktivitätsvergleiche ist also der Bereich hoher Enzymkonzentrationen und damit stark verkürzter  $t_0$ -Werte zu vermeiden, was bereits bei den vorausgehenden Versuchen berücksichtigt wurde. In Zweifelsfällen wurde durch zwei Versuche mit verschiedenen Enzymkonzentrationen geprüft, ob noch im „Proportionalitätsbereich“ gearbeitet wurde.

### b) $p_H$ -Einfluß

An einem *Asp. niger*-Extrakt wurde die  $p_H$ -Abhängigkeit der Dehydrierung von m/200-Palmitat und Oleat untersucht. Dabei ergaben sich recht ausgesprochene Optima: für Palmitat  $p_H$  7,0, für Oleat  $p_H$  6,5 (Abb. 3).

Daß der optimale Bereich für Palmitat etwas höher liegt, ist wahrscheinlich auf die hier mit dem  $p_H$  stärker ansteigende Löslichkeit des (ja nur teilweise gelösten) Substrates zurückzuführen.

### c) Einfluß der Substratkonzentration

Die Dehydrierung des ausreichend löslichen Kaliumoleats mit *Asp. niger*-Extrakt ergab eine optimale Zone zwischen  $5,0$  und  $7,5 \cdot 10^{-3}$  m (Abb. 4). Die

bisher verwendete Substratkonzentration war also optimal gewesen. Die Dissoziationskonstante der Enzym-Substrat-Verbindung (Michaelis-Konstante) wird graphisch zu rund  $2 \cdot 10^{-3}$  m ermittelt.

Die Werte sind relativ niedrig. Beim Gerstenenzym war die optimale Oleatkonzentration zu  $1,5 \cdot 10^{-2}$  m, die Michaelis-Konstante zu  $9,6 \cdot 10^{-3}$  m bestimmt worden (FRANKE u. FREHSE 1954).

### 5. Zur Spezifität der Fettsäuredehydrogenasen

Zur Orientierung wurden die geradzahligen gesättigten Fettsäuren von  $C_4$  bis  $C_{18}$ , dazu die beiden ungesättigten  $C_{18}$ -Säuren Ölsäure und Linol-

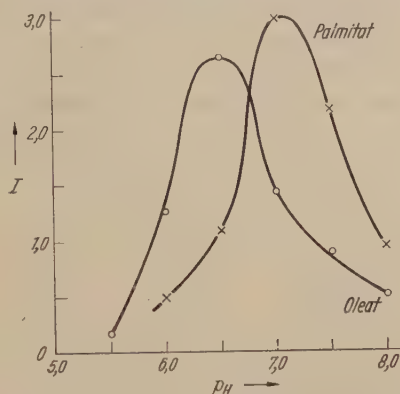


Abb. 3.  $p_H$ -Abhängigkeit der Palmitat- und Oleat-Dehydrierung durch *Asp. niger*-Extrakt

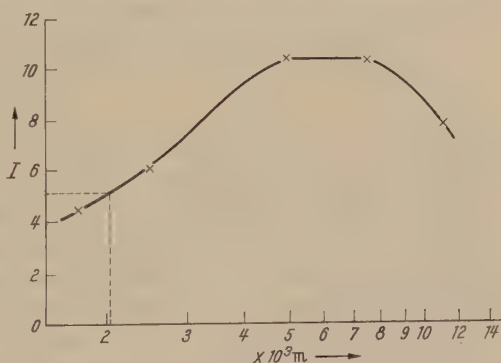


Abb. 4. Einfluß der Substratkonzentration auf die Oleat-dehydrierung durch *Asp. niger*-Extrakt. Gestrichelte Linien zur Ermittlung der Michaelis-Konstanten



säure in „Normalansätzen“ (S. 361) mit *Asp. niger*-Extrakt auf ihre H-Donatorfunktion geprüft. Das Ergebnis zeigt Abb. 5.

Die Aktivität  $I_0$  steigt von  $C_6$  bis  $C_{18}$  fast kontinuierlich an. Daß Buttersäure etwas rascher angegriffen wird als Capron- und Caprylsäure, hängt möglicherweise mit der bekannten Hemmungswirkung der mittleren Fettsäuren (vgl. I. Mitteilung) zusammen.

Die optimalen Substrate sind *Palmitin-* und *Stearinsäure*. Ölsäure wird nur unwesentlich langsamer angegriffen, während Linolsäure liegen bleibt.

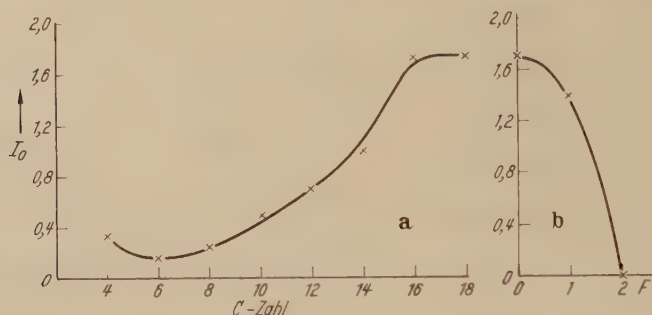


Abb. 5. Dehydrierung der geradzahigen Fettsäuren (m/200) durch *Asp. niger*-Extrakt.  
a Gesättigte Fettsäuren von  $C_4$ – $C_{18}$ , b  $C_{18}$ -Fettsäuren ohne und mit Doppelbindungen (F)

Beziehungen zwischen Dehydrierbarkeit und Ausmaß der Methylketonbildung (I. Mitteilung) bestehen ersichtlich nicht.

Daß *Linolsäure* tatsächlich nicht dehydriert wird und ihre Dehydrierung nicht etwa durch eine Erhöhung von  $t_0$  nur verdeckt ist, ergab sich aus einem Versuch mit *Asp. niger*-Extrakt, in dem *Linolsäure* in der üblichen Konzentration (m/200) zu den gut angreifbaren Substraten *Palmitin-* oder *Ölsäure* zugesetzt wurde. Die Entfärbungszeit  $t$  erhöhte sich durch diesen Zusatz nur um resp. 17 bzw. 10%, was nicht als spezifischer Hemmungseffekt, sondern wohl nur als Wirkung der gesteigerten Gesamt-Fettsäurekonzentration (vgl. Abb. 4) zu deuten ist.

Ganz ähnliche Verhältnisse wurden bei Extrakten aus *Rhiz. tonkinensis* angetroffen; doch lagen die  $I_0$ -Werte etwas unter denen von *Asp. niger* und ein Angriff von Capron- und Caprylsäure war nicht mehr mit Sicherheit festzustellen.

Beim Vergleich des Schimmelpilzenzyms mit dem der höheren Pflanzen ergibt sich als gemeinsam die Bevorzugung der höheren Fettsäuren (FRANKE u. FREHSE 1954, 1957, FREHSE u. FRANKE 1956). Von den  $C_{18}$ -Säuren bevorzugen manche Pflanzensamen (Kürbis, Raps, Rüben) die gesättigte, andere (Gramineen, Soja, Lein) die ungesättigten Säuren.

### 6. Enzymstabilität

Im Laufe der vorausgegangenen Versuche hatte sich immer wieder gezeigt, daß die Mycelextrakte wenig stabil waren und relativ rasch ihre Aktivität einbüßten. Zur genaueren Feststellung wurde ein Extrakt aus *Rhiz. tonkinensis* geteilt und die eine Hälfte in einem Wasserbad von Raumtemperatur (18°C), die andere in Eiswasser 12 Std aufbewahrt. Die Intensität der Palmitatdehydrierung war nach dieser Zeit bei 0°C auf 51%, bei 18°C auf 31% des Ausgangswerts abgesunken. In einer weiteren Versuchsreihe wurde die zeitliche Abnahme der Aktivität eines *Asp. niger*-Extrakts bei 0°C gemessen. Sie betrug (gegenüber Palmitat):

nach Stunden	0	2	4	6	8	12	20
Prozent	(100)	97	93	82	76	47	~ 0

Auch die *Thermostabilität* des Schimmelpilzenzyms ist gering. Zur Bestimmung der Temperaturempfindlichkeit wurden Extraktproben aus *Asp. niger* jeweils 30 min lang auf resp. 35, 40, 45 und 50°C im Wasserbad erwärmt und anschließend die Aktivität wie üblich bei 30°C ermittelt. Das Ergebnis des Versuchs zeigt Abb. 6. Die „Tötungstemperatur“ nach der Definition v. EULERS (1925) ergab sich — an Oleat geprüft — zu nur 43°C, während z. B. die Gersten-„lipodehydase“ den Wert von 57°C aufgewiesen hatte (FRANKE u. FREHSE 1954).

### 7. Verhalten bei Dialyse; Reaktivierungsversuche

Der Aktivitätsverlust beim Altern von Enzymlösungen konnte entweder auf eine Schädigung des Apoferments oder eine Inaktivierung etwa notwendiger Co-faktoren zurückgehen. Zur Klärung dieser Frage wurde ein Extrakt aus *Rhiz. tonkinensis* im Kühlraum bei 5°C gegen dest.

Wasser dialysiert und nach 2 und 4 Std die Aktivität gegen Palmitat und Oleat bestimmt. Ein Kontrollansatz, der nur bei 5°C gehalten, aber nicht dialysiert wurde, lief mit. Da bei der Dialyse eine sehr starke Aktivitätsabnahme eintrat, die für Coenzymverlust sprach, wurde den dialysierten Ansätzen — nach Erfahrungen bei der Palmitatdehydase der Erdnuß (FRANKE u. HEINEN 1958 b) — zunächst DPN (Codehydase I) zugesetzt. Das Resultat dieser Versuchsreihe ist in Tab. 6 enthalten.

Es ist zu bemerken, daß Palmitat- und Oleat-Dehydrierung sich hinsichtlich In- und Reaktivierung vollständig gleichartig verhalten, was nicht selbstverständlich ist, da im Pflanzensamen nur die Palmitat-, nicht

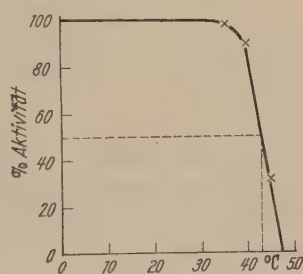


Abb. 6. Temperatureinfluß auf die Stabilität des oleatdehydrierenden Enzyms aus *Asp. niger*.

Gestrichelte Linien zur Ermittlung der „Tötungstemperatur“

die Oleat- (und Linolat-)Dehydrierung DPN-abhängig ist (FRANKE u. HEINEN 1958b). DPN-Zugabe bewirkt sowohl nach 2 wie nach 4 Std nahezu vollständige Reaktivierung in den dialysierten Ansätzen, wenn man berücksichtigt, daß auch der nicht dialysierte Extrakt nach 4 Std nur noch 90% der Ausgangsaktivität besaß. Es ist allerdings nicht bewiesen, daß sich dieser Aktivitätsverlust von 10% nur auf das Apoferment bezog.

Tabelle 6. *Aktivitätsverlust eines Extrakts aus Rhiz. tonkinensis bei der Dialyse und Reaktivierungsversuch mit DPN*

Enzymlösung (Tr.-gew. 3,1 mg/ml)	Substrat	$t_0$	$t$	$I$	$I_0$	% $I_0$	Zusatz
Frisch . . . . .	Palm.-S. Öl-S.	78	19 24	3,9 2,8	1,26 0,91	100	—
2 Std dialysiert . . .	Palm.-S. Öl-S.	90	45 56	1,1 0,69	0,36 0,22	28 24	—
	Palm.-S. Öl-S.	30	14 17	3,8 2,6	1,22 0,84	96 92	170 µg DPN
4 Std dialysiert . . .	Palm.-S. Öl-S.	240	86 105	0,74 0,53	0,24 0,17	19 19	—
	Palm.-S. Öl-S.	180	27 33	3,2 2,5	1,03 0,81	82 88	170 µg DPN
4 Std aufbewahrt . .	Palm.-S. Öl-S.	180	25 32	3,45 2,55	1,12 0,82	89 90	—

Zur weitergehenden und dabei möglichst schonenden Entfernung von Cofaktoren wurde an einem *Asp. niger*-Extrakt eine 6stündige „Intensivdialyse“ (S. 360) bei 5°C durchgeführt und anschließend die Aktivität ohne und mit DPN-Zusatz (150 µg) geprüft (Tab. 7).

Tabelle 7. *Fettsäurehydrierung durch Asp. niger-Extrakt nach 6stündiger Intensivdialyse ohne und mit Cofaktoren-Zusatz*

Enzymlösung (Tr.-gew. 8,6 mg)	Substrat	$t_0$	$t$	$I$	$I_0$	% $I_0$	Zusätze <sup>1</sup>				
							DPN	CoA	ATP	Mg <sup>++</sup>	GSH
frisch	Palm.-S. Öl-S.	59	9 11	9,5 7,5	1,10 0,88	100	—	—	—	—	—
Nach 6 Stdn Intensiv- dialyse	Palm.-S. Öl-S.	130	94 90	0,30 0,34	0,035 0,040	3 5	—	—	—	—	—
	Palm.-S. Öl-S.	72	28 33	2,2 1,6	0,26 0,19	23 21	+	—	—	—	—
	Palm.-S. Öl-S.	37	11 13	6,4 5,0	0,75 0,58	68 66	+	+	+	+	+

<sup>1</sup> Mengen (in µg): 150 DPN, 400 CoA, 1000 ATP, 150 Mg<sup>++</sup>, 300 GSH.



Wie ersichtlich, ist die Aktivität nach der Intensivdialyse auf wenige Prozente des Ausgangswerts abgesunken. Zusatz von DPN allein reaktiviert aber nur mehr zu rund 22%. Daher wurde (letzte Doppelreihe der Tab. 7) auch die Wirkung weiterer, bei Fettsäuredehydrasen tierischer (vgl. GREEN 1954) oder pflanzlicher Herkunft (Mitochondrien, STUMPF u. BARBER 1956) benötigter Cofaktoren geprüft, wobei die Dosierung in Anlehnung an MII u. GREEN (1954), bei SH-Glutathion an STUMPF u. BARBER (1956) erfolgte. Der Reaktivierungsgrad erhöht sich nunmehr

Tabelle 8. *Wirkung verschiedener Cofaktoren auf die Fettsäuredehydrierung durch Asp. niger-Extrakt nach 3stündiger Intensivdialyse*

Enzymlösung (Tr.-Gew. 8,9 mg)	Substrat	$t_0$	$t$	$I$	$I_0$	% $I_0$	Zusätze				
							DPN	CoA	ATP	Mg <sup>++</sup>	GSH
frisch	Palm.-S.	72	11	7,7	0,96	100	—	—	—	—	—
	Öl.-S.		10	8,6	0,86						
Nach 3 Std Intensiv- dialyse	Palm.-S.	140	58	1,0	0,12	13	—	—	—	—	—
	Öl.-S.		63	0,87	0,10	12					
	Palm.-S.	97	25	3,0	0,36	38	—	+	+	+	+
	Öl.-S.		26	2,8	0,34	40					
	Palm.-S.	78	24	2,9	0,35	36	TPN	+	+	+	+
	Öl.-S.		25	2,7	0,33	38					
	Palm.-S.	70	16	4,8	0,58	60	+	—	+	+	+
	Öl.-S.		16	4,8	0,58	67					
	Palm.-S.	65	12	6,8	0,82	86	+	+	—	+	+
	Öl.-S.		13	6,2	0,75	87					
	Palm.-S.	57	11	7,4	0,89	93	+	+	+	—	+
	Öl.-S.		11	7,4	0,89	104					
	Palm.-S.	57	10	8,2	0,99	103	+	+	+	+	—
	Öl.-S.		11	7,4	0,89	104					
	Palm.-S.	56	10	8,2	0,99	103	+	+	+	+	+
	Öl.-S.		10	8,2	0,99	115					

auf rund 67% des Ausgangswerts. Der Wert ist unsicher. Bei Berücksichtigung des verkürzten  $t_0$ -Werts im Coenzymansatz würde er sich nach Abb. 1 (S. 362) um fast  $\frac{1}{5}$  reduzieren, was jedoch bei Interpretation des Alterungsverlusts (S. 371) als reinen Apofermentdefekts praktisch wieder kompensiert würde.

Da nach diesem Versuch eine Schädigung des Apoenzyms wahrscheinlich war, wurde in einer weiteren Versuchsreihe nur 3stündige Intensivdialyse bei 5°C angewandt. In einem Ansatz wurden sämtliche Cofaktoren (in der in Tab. 7 angegebenen Menge) zugesetzt, in den übrigen Reaktivierungsansätzen jeweils einer weggelassen; alternativ für DPN wurde auch TPN geprüft. Tab. 8 orientiert über das Ergebnis.

Der Tabelle läßt sich entnehmen, daß nach 3stündiger Intensivdialyse, die einen fast 90%igen Aktivitätsverlust bewirkt, durch Zusatz der Cofaktoren eine vollständige Reaktivierung der Fettsäuredehydrierung erreichbar ist. Den relativ größten Effekt hat der DPN-Zusatz, während  $Mg^{++}$  und SH-Glutathion (letzteres gewöhnlich als Schutz für die SH-Form von CoA zugesetzt) hier nahezu wirkungslos sind. DPN kann nicht durch TPN ersetzt werden.

Da  $t_0$  sich in dieser Versuchsreihe nur um maximal 22% gegenüber dem Ausgangsversuch verkürzt, dürfte die entsprechende „Scheinaktivierung“ nach Abb. 1 bei 10% liegen; die etwas zu hohen Werte für  $\%I_0$  der letzten Reihen finden so wohl ihre Erklärung.

## 8. Orientierende Reinigungsversuche

### a) Acetonfällung

Dieses bei Oxydationsfermenten aus Schimmelpilzen bisweilen zur Anreicherung und Gewinnung von Trockenpräparaten brauchbare Verfahren (vgl. z. B. FRANKE u. DEFFNER 1939, FRANKE u. KRIEG 1952) hatte im vorliegenden Falle keinen Erfolg. Ein *Asp. niger*-Extrakt wurde bei  $-5^\circ C$  unter Rühren vorsichtig mit dem gleichen Volumen vorgekühlten Acetons versetzt, wobei die Temperatur nicht über  $+4^\circ C$  anstieg. Die Prüfung der abzentrifugierten und wieder gelösten Fällung ergab einen rund 70%igen Aktivitätsverlust gegenüber dem Rohextrakt, selbst in Gegenwart aller Cofaktoren. Immerhin hatte das Trockenpräparat nach 3 Wochen langer Aufbewahrung bei  $5^\circ C$  noch rund  $3/4$  seiner ursprünglichen Aktivität.

### b) Ammonsulfatfällung

Es wurden zwei Versuche bei 70 und bei 80%iger Sättigung eines *Asp. niger*-Extrakts mit festem Ammonsulfat ausgeführt. Die in Wasser aufgenommenen Fällungen waren als solche fast inaktiv, ließen sich aber durch Zusatz der üblichen Cofaktoren weitgehend reaktivieren. Mit einer Anreicherung war die Fällung jedoch in keinem Fall verbunden; die  $I_0$ -Werte der komplettierten Lösungen erreichten nur  $2/3$ — $3/4$  des Ausgangswerts. Immerhin zeichneten sich die Lösungen dieser Ammonsulfatfällungen durch außergewöhnlich hohe  $t_0$ -Werte aus, so daß einwandfreie Reaktivierungseffekte erhalten werden konnten. Tab. 9 zeigt das Ergebnis des Reaktivierungsversuchs mit der 80%igen Ammonsulfatfällung im wesentlichen in der Anordnung der Tab. 8.  $Mg^{++}$  und SH-Glutathion wurden, da auch hier unwirksam, in der Aufstellung weggelassen. In der 3. Doppelreihe ist ein Versuch mit DPN-Zusatz allein verzeichnet. Die Zusatzmengen entsprachen denen von Tab. 7.

Bis auf die hier unvollständige Reaktivierung entspricht das Resultat vollkommen demjenigen der Tab. 8. Ob zu vollständiger Reaktivierung

Fällung bei noch höherer Ammonsulfatkonzentration oder Fällung unter besonderen, die Apofermente schonenden Bedingungen erforderlich ist, bedarf weiterer Untersuchungen.

Tabelle 9. *Einfluß verschiedener Cofaktoren auf die Fettsäuredehydrierung durch eine Ammonsulfatfällung (80% Sättigung) von Asp. niger-Extrakt*

Enzymlösung	Substrat	$t_0$	$t$	$I$	$I_0$	% $I_0$	Zusätze		
							DPN	CoA	ATP
Rohextrakt (Tr.-gew. 7,35 mg/ml)	Palm.-S. Öl.-S.	57	8 9	10,7 9,3	1,46 1,25	100	—	—	—
Ammonsulfatfällung (Tr.gew. 7,61 mg/ml)	Palm.-S. Öl.-S.	$\geq 800$	400 400	0,25 0,25	0,03 0,03	2 2	—	—	—
	Palm.-S. Öl.-S.	$> 800$	25 27	4,0 3,65	0,53 0,48	36 38	+	—	—
	Palm.-S. Öl.-S.	$> 800$	29 33	3,45 3,05	0,45 0,40	31 32	—	+	+
	Palm.-S. Öl.-S.	$> 800$	16 21	6,2 4,7	0,82 0,62	56 50	+	—	+
	Palm.-S. Öl.-S.	$> 800$	14 16	7,2 6,25	0,94 0,82	65 66	+	+	—
	Palm.-S. Öl.-S.	500	12 14	8,1 7,15	1,06 0,94	73 75	+	+	+

### Diskussion

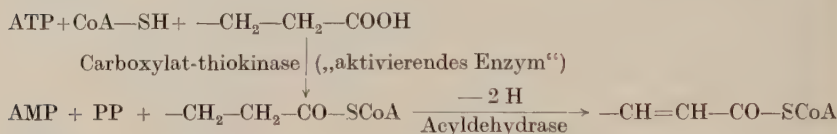
Der erstmals in Schimmelpilzen erbrachte Nachweis von Fettsäuredehydrasen bietet in mehrfacher Hinsicht Interesse. Quantitative Beziehungen zur lange bekannten und neuerdings (vgl. I. Mitteilung) verbreiteter nachgewiesenen Methylketonbildung durch Schimmelpilze bestehen nicht. Auffallenderweise werden die eigentlichen Nahrungsfettsäuren ( $C_{16}$  und  $C_{18}$ ) am leichtesten dehydriert, während gerade aus diesen keine Methylketonbildung mehr erfolgt (Literatur s. I. Mitteilung). Wahrscheinlich fällt die Decarboxylierung der entsprechenden  $\beta$ -Ketocarbonsäuren nicht mehr in den Spezifitätsbereich der (in verschiedenen Penicillien wahrscheinlich gemachten)  $\beta$ -Ketodecarboxylase für Säuren mittlerer Kettenlänge (KARRER u. HAAB 1948). Diese Vermutung wird zur Zeit näher geprüft und scheint sich zu bestätigen.

Im Gegensatz zu der auf höhere gesättigte Fettsäuren eingestellten Palmitatdehydrase der Erdnußsamen (wahrscheinlich in den Mikrosomen lokalisiert), die nur DPN benötigt (FRANKE u. HEINEN 1958b), und zu der davon verschiedenen Oleat- und Linolatdehydrase der Erdnuß und der Gerste, die überhaupt kein dissociables Coenzym benötigen (FRANKE u. HEINEN 1958b), braucht das Schimmelpilzenzym zur vollen Aktivität DPN, CoA und ATP, und zwar sowohl für die Dehydrierung von



Palmitat als auch von Oleat. Ob es sich dabei um ein oder zwei Enzyme handelt, ist noch nicht sicher entschieden; von dem Befund eines variierenden quantitativen Verhältnisses von Palmitat- zu Oleatdehydrierung in verschiedenen Schimmelpilzen (S. 367) abgesehen sprechen die experimentellen Tatsachen eher für das Vorliegen *eines* Enzyms.

Bezüglich des Cofaktorenbedarfs ist das Schimmelpilzferment den bisher bekannten tierischen (vgl. Übersicht bei LYNNEN 1955) und bakteriellen Fettsäuredehydrasen (vgl. FRANKE u. FREHSE 1957) an die Seite zu stellen, wahrscheinlich auch dem pflanzlichen Mitochondrienenzym, was jedoch wegen der im letzteren Falle ganz abweichenden Untersuchungsmethodik (oxydative  $C^{14}O_2$ -Bestimmung aus markierten Fettsäuren, STUMPF u. BARBER 1956) nicht sicher zu sagen ist. Es handelt sich beim Schimmelpilzferment also eigentlich um ein Fermentsystem. Die ersten Phasen des Fettsäureangriffs erfolgen höchstwahrscheinlich nach dem Schema:



Die bisher näher untersuchten (tierischen) Acyldehydrasen sind *Flavin-Proteide*, zum Teil mit Kupfer- oder (problematischem) Eisengehalt (MAHLER 1954, 1956; CRANE, MII, HAUGE, GREEN u. BEINERT 1956). Bei ihrer Reaktion mit Acceptoren schiebt sich noch ein „elektronenübertragendes“ Flavin-Proteid dazwischen (CRANE u. BEINERT 1956). Unsere Versuche sagen nichts aus über einen eventuellen Flavingehalt des wirk-samen Fermentsystems. Auffallend ist indes, daß in unseren Versuchen an (durch Dialyse oder Ammonsulfatfällung) inaktivierten Fermentpräparaten stets DPN zur Reaktivierung notwendig war; in kurz-dauernden Dialyseversuchen war sogar mit DPN *allein* praktisch voll-ständige Reaktivierung zu erzielen (S. 372).

Drei Deutungsmöglichkeiten scheinen gegeben: 1. die Acyldehydrase der Schimmelpilze ist ein dissoziabiles *Pyridin-Proteid*; 2. in den Schimmelpilz-Extrakten finden sich nebeneinander ein Enzym vom „Mikrosomentyp“ und vom „Mitochondrientyp“; 3. DPN greift erst später, nach enzymatischer Hydratisierung der ungesättigten Säure zur  $\beta$ -Oxysäure (durch eine „Enoylhydratase“), als Coenzym der  $\beta$ -Oxyacyl-dehydrase (vgl. WAKIL, GREEN, MII u. MAHLER 1954), ein.

Im letztgenannten Falle hat eine Reaktivierung durch DPN-Zusatz zur Voraussetzung, daß das die *primäre* Dehydrierung in gewissem Um-fang abläuft. Zweifellos ist bei unseren relativ kurzdauernden Dialyse-

versuchen keine vollständige Entfernung von CoA und ATP erfolgt. Eher dürfte dies in den Versuchen mit Ammonsulfatfällungen (vgl. Tab. 9) der Fall sein. Trotzdem erfolgt auch dort mit DPN *allein* eine relativ beträchtliche Reaktivierung. Dies läßt den dritten Deutungsversuch zunächst weniger wahrscheinlich erscheinen. Doch können erst weitere Versuche zur Auftrennung des komplexen Enzymsystems der Pilzextrakte Klarheit schaffen.

### Zusammenfassung

1. In Schimmelpilz-Extrakten sowohl von guten als auch schlechten Methylyketonbildnern wurden Fettsäuredehydrasen nach der Thunberg-Methodik nachgewiesen. Ihre Aktivität läßt sich durch Züchtung der Pilze in Nährlösungen mit Zusatz von Tween oder Fettsäure + Tween steigern. Sie sind auch in mitochondrienfreien Extrakten enthalten.

2. Optimale Substrate sind Palmitin-, Stearin- und Ölsäure. Niedere Fettsäuren werden schlecht, Linolsäure nicht angegriffen. Das  $p_H$ -Optimum liegt zwischen 6,5 und 7.

3. Es handelt sich um sehr labile Enzyme, die ihre Wirkung in Lösung rasch verlieren, insbesondere bei etwas erhöhter Temperatur.

4. Dialysierte Lösungen wie auch wieder gelöste Ammonsulfatfällungen zeigen unter Umständen fast keine Wirkung mehr. Durch Zusatz von DPN, CoA und ATP ist weitgehende bis vollständige Reaktivierung möglich.

5. Bei den Fettsäuredehydrasen der Schimmelpilze handelt es sich um komplexe Enzymsysteme; wahrscheinlich geht die Dehydrierung ähnlich wie in tierischen und Bakterienzellen ganz oder zum größeren Teil über die Coenzym A-Derivate der Fettsäuren. Ungeklärt und neuartig ist die Rolle des DPN im Enzymsystem der Schimmelpilze; Möglichkeiten seiner Reaktion werden diskutiert.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für eine Sachbeihilfe, dem Verband der Chemischen Industrie für Mittel zur Literaturbeschaffung.

### Literatur

C. F. Boehringer u. Söhne: „Biochemica“, Information DPN-DPNH (Mannheim 1955).

CRANE, F. L., u. H. BEINERT: J. biol. Chem. **218**, 717 (1956). — CRANE, F. L., S. MILL, J. G. HAUGE, D. E. GREEN u. H. BEINERT: J. biol. Chem. **218**, 701 (1956).

FLIEG, O.: Jb. Bot. **61**, 24 (1922). — FRANKE, W.: Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handb. physiol.- u. pathol.-chem. Analyse **II**, 311 (Berlin, Göttingen, Heidelberg 1955). — FRANKE, W., u. M. DEFFNER: Justus Liebigs Ann. Chem. **541**, 117 (1939). — FRANKE, W., u. H. FREHSE: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **298**, 1 (1954). — Handb. d. Pflanzenphysiol. **VII**, 137 (Berlin, Göttingen, Heidelberg 1957). — FRANKE, W., u. W. HEINEN: Arch. Mikrobiol. **32**, 50 (1958 a). — Getreide u. Mehl (im Druck) (1958 b). — FRANKE, W., u. L. KRIEG: Chem. Ber. **85**, 779 (1952). — FRANKE, W., u. I. SCHULZ (mit W. DE BOER): Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **303**, 30 (1956.) —

FRANKE, W., G. TASCHEN u. H. FREHSE: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. **303**, 58 (1956). — FRANKE, W., E. M. TAHA u. L. KRIEG: Arch. Mikrobiol. **17**, 255 (1952). — FREHSE, H., u. W. FRANKE: Fette u. Seifen **58**, 403, 593 (1956). — FRIES, N., u. H. M. YUSEF: Physiologia Plantarum **8**, 852 (1955).

GIROLAMI, R. L., u. S. G. KNIGHT: Appl. Microbiol. **3**, 264 (1955). — GREEN, D. E.: Biol. Rev. **29**, 330 (1954).

HINSBERG, K., u. K. LANG: Medizinische Chemie, S. 61 (München u. Berlin 1951). — HUMPHREYS, T. E., E. H. NEWCOMB, A. H. BOKMAN u. P. K. STUMPF: J. biol. Chem. **210**, 941 (1954). — HUMPHREYS, T. E., u. P. K. STUMPF: J. biol. Chem. **213**, 941 (1955).

KARRER, P., u. F. HAAB: Helv. chim. Acta **31**, 795 (1948). — KARSTRÖM, H.: Ergebn. Enzymforsch. **7**, 350 (1938).

LYNEN, F.: Justus Liebigs Ann. Chem. **574**, 33 (1951). — Angew. Chemie **67**, 463 (1955).

MAHLER, H. R.: J. biol. Chem. **206**, 13 (1954). — Advanc. Enzymol. **17**, 233 (1956). — MII, S., u. D. E. GREEN: Biochim. biophys. Acta **13**, 425 (1954). — MUKHERJEE, S.: Arch. Biochem. **33**, 364 (1951).

RÖMPP, H.: Chemielexikon, S. 4431 (Stuttgart 1958).

STUMPF, P. K., u. G. A. BARBER: Plant Physiol. **31**, 304 (1956).

WAKIL, S. J., D. E. GREEN, S. MII u. H. R. MAHLER: J. biol. Chem. **207**, 631 (1954).



## Der Feinbau der Plastiden von *Rhopalocystis oleifera*\*

Von

BRUNO SCHUSSNIG

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 31. Mai 1958)

In meiner vorläufigen Mitteilung über diese neue Chlorococcalen-Gattung (SCHUSSNIG 1955)<sup>1</sup> ging ich auch kurz, auf Grund meiner Beobachtungen mit dem Licht- und dem Phasenkontrastmikroskop, auf die Struktur der Plastiden ein. Ich schrieb damals, „daß im Phasenkontrastlicht die lamelläre Feinstruktur des Chromatophors zu erkennen ist (l. c., S. 448, Abb. 1, Fig. 4; Abb. 6). Das Phasenkontrastlicht läßt auch erkennen, daß Grana nicht vorhanden sind . . .“. Ein weiterer Anhaltspunkt für diese Anschauung ergab sich beim Nachweis der Stromastärke und ich sagte dort (l. c. S. 451): „Eine Prüfung im Phasenkontrastlicht läßt die Vorstellung zu, daß die Körnchen der Stromastärke zwischen den Lamellen der Plastidensubstanz eingelagert sind. Man gewinnt den Eindruck, daß die Lamellen an den Stellen, an denen die Stärkekörnchen kondensiert werden, etwas auseinanderweichen (l. c. Abb. 1, Fig. 4; Abb. 6). Das ergibt ein Bild, das bei flüchtiger Beobachtung eine Granastruktur vortäuscht. Wie gesagt aber, sind Grana, bei 2025facher Vergrößerung im normalen und Phasenkontrastbild, nicht auszunehmen.“

Nichts lag daher näher, als diese vorläufigen Befunde einer elektronenmikroskopischen Überprüfung zu unterziehen<sup>2</sup>.

Ich kann gleich hier vorausschicken, daß dadurch meine oben ausgesprochenen Vermutungen bestätigt wurden. An Hand einiger Bilder mögen im folgenden die erzielten Ergebnisse besprochen werden.

In Abb. 1 ist ein Fragment eines Längsschnittes durch die Zelle bei 33000facher Vergrößerung wiedergegeben. In diesem Schnitt sind außer den peripheren Plastidenrändern der Zellkern (Abb. 1, 3) und das

---

\* Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. RICHARD HARDER zu seinem siebzigsten Geburtstag in aufrichtiger Verehrung gewidmet.

<sup>1</sup> Inzwischen wurde diese Alge cytologisch und entwicklungsgeschichtlich von meinem Schüler LOTHAR TÄUMER eingehend untersucht; seine Ergebnisse werden anderwärts veröffentlicht werden.

<sup>2</sup> Dem Direktor des Instituts für Mikrobiologie und experimentelle Therapie der Deutschen Akademie der Wissenschaften in Jena, Herrn Prof. Dr. H. KNÖLL, möchte ich gleich an dieser Stelle für die Erlaubnis, diese Untersuchungen in seinem Institut durchführen zu können, meinen Dank abstatten. Zu besonderem Dank bin ich Herrn Dr. NIKLOWITZ für die sachkundige Herstellung der Ultradünnschnitte und der elektronenmikroskopischen Aufnahmen verpflichtet.

Pyrenoid (Abb. 1, 4) getroffen. Letzteres liegt in einem Lappen des Chloroplasten eingebettet. Links oben, beim Pfeil 1, ist ein länglicher



Abb. 1. *Rhopalocystis oleifera*. Fragment eines Längsschnittes durch die Zelle. Vergr. 33000 $\times$ .  
 1 Grundplasma, 2 Plastide, 3 Zellkern, 3' Einkerbung, 3'' schnabelförmiger Fortsatz desselben,  
 4 Pyrenoid, 5 Stromastärke, 6 Pyrenoidstärke, 7 Mitochondrien, 7' und 7'' Teilungsstadien,  
 8 Metaphosphat, 9 osmiophile Granula. (Aufnahme Dr. NIKLOWITZ)

heller Raum sichtbar, welcher einen Teil des Cytoplasmas darstellt. Ein Strukturbild eines größeren Cytoplasma-Raumes ist in Abb. 3, 1 wiedergegeben. Die reticulare Textur des Grundplasmas ist deutlich zu erkennen, Tubuli-artige Elemente sind ebenfalls wahrzunehmen. Schon an dieser Aufnahme sieht man die laminare Struktur der Plastiden, wobei, ähnlich wie bei *Chlamydomonas reinhardi* (SAGER u. PALADE 1954), *Chlorella pyrenoidosa* (ALBERTSON u. LEYON 1954), *Euglena gracilis* var. *bacillaris* (WOLKEN u. PALADE 1953), *Ankistrodesmus braunii* (STEFFEN u. WALTER 1955) u. a., die grundsätzlich flächenparallele Lagerung der Lamellen deutlich zu erkennen ist. Die Abstände zwischen den Lamellen sind nicht ganz gleichmäßig, sondern die Lamellen zeigen, vorausgesetzt, daß es sich nicht um ein Präparationsartefakt handelt, eine Neigung zur Bündelung, oder richtiger gesagt, zur Bildung von Lamellenlagen, zwischen denen ein etwas weiterer Abstand als zwischen den einzelnen Lamellen selbst entsteht. Die länglichen, hell erscheinenden Lacunen zeigen die Orte an, in denen die stromatischen Stärkekörnchen gelegen sind (Abb. 1, 5; Abb. 2, 4; Abb. 3, 3). Offenbar werden diese Stärkekörnchen bei der präparativen Vorbehandlung herausgelöst, da in den Lacunen keine wie immer geartete Struktur wahrzunehmen ist. Es zeigt sich somit, daß die Stromastärke zwischen den Lamellen kondensiert wird und daß die Lamellen diesen Kondensationsorten ausweichen. Ferner sieht man, daß in den Lacunen Reste der globulären Stroma-substanz enthalten sind, was bei 53000facher Vergrößerung in Abb. 2, 4 noch deutlicher zum Vorschein kommt. In diesen stromatischen Inseln liegen kleine osmiophile Granula, entweder in unmittelbarer Nachbarschaft der Stärkekörner oder auch für sich allein, eingeschlossen (siehe Abb. 1, 9; Abb. 2, 5; Abb. 3, 5). Die Osmiophilie dieser Granula deutet auf ihren Lipoidgehalt hin. Daß in den Plastiden eine Lipoidkomponente enthalten ist, geht aus den verschiedensten Analysen hervor, doch ist diese molekular eingebaut und somit lamellar angeordnet. Es fragt sich daher, ob das Vorhandensein der im elektronenmikroskopischen Bild in Erscheinung tretenden Granula dem Nativzustand entspricht, oder ob es sich vielleicht um eine präparative Ausfällung handelt. Diese Frage ist schwer zu beantworten, weil ein mikrochemischer Nachweis dieser nur 10—20  $m\mu$  in der Breite und 30—50  $m\mu$  in der Länge messenden Granula im Lichtmikroskop nicht möglich ist. Auch eine diffuse Rotfärbung bei Zusatz von Sudan III war nicht zu erkennen. Demgegenüber muß aber hervorgehoben werden, daß diese in Rede stehenden osmiophilen Körnchen in allen Schnitten durch die Plastiden, in der angegebenen Lokalisierung, sichtbar sind.

In Abb. 2 ist ein Ausschnitt aus der Aufnahme in Abb. 1 bei 53000facher Vergrößerung wiedergegeben. Betrachtet man hier die Laminae genauer (Abb. 2, 2), so nimmt man wahr, daß sie mindestens aus



zwei Lamellen aufgebaut sind. Das Bild erinnert an die Lamellen von *Poteriochromonas*, bei denen WOLKEN u. PALADE (1953) auch zwei dichte,

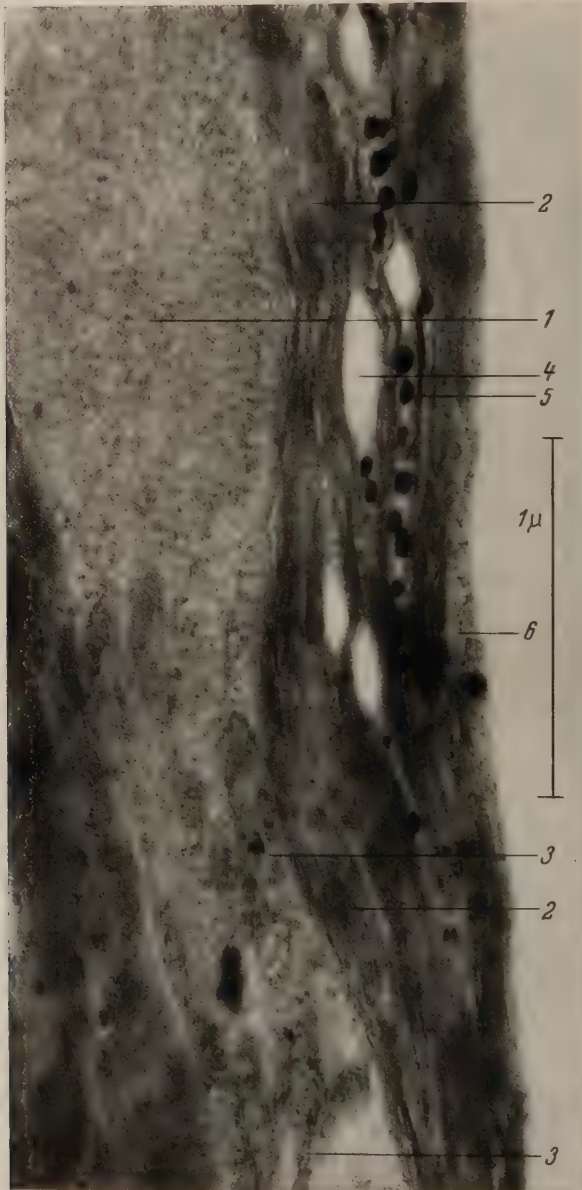


Abb. 2. *Rhopalocystis oleifera*. Ein Teil der Abb. 1 bei 53000facher Vergrößerung. 1 Zellkern, 2 Plastide, 3 Mitochondrien, 4 Stromastärke, 5 osmiophile Granula, 6 Peristromium.  
(Aufnahme Dr. NIKLOWITZ)

60—100 Å dicke Schichten, zu beiden Seiten einer zentralen helleren Schicht, festgestellt haben. Eine ähnliche zusammengesetzte Struktur

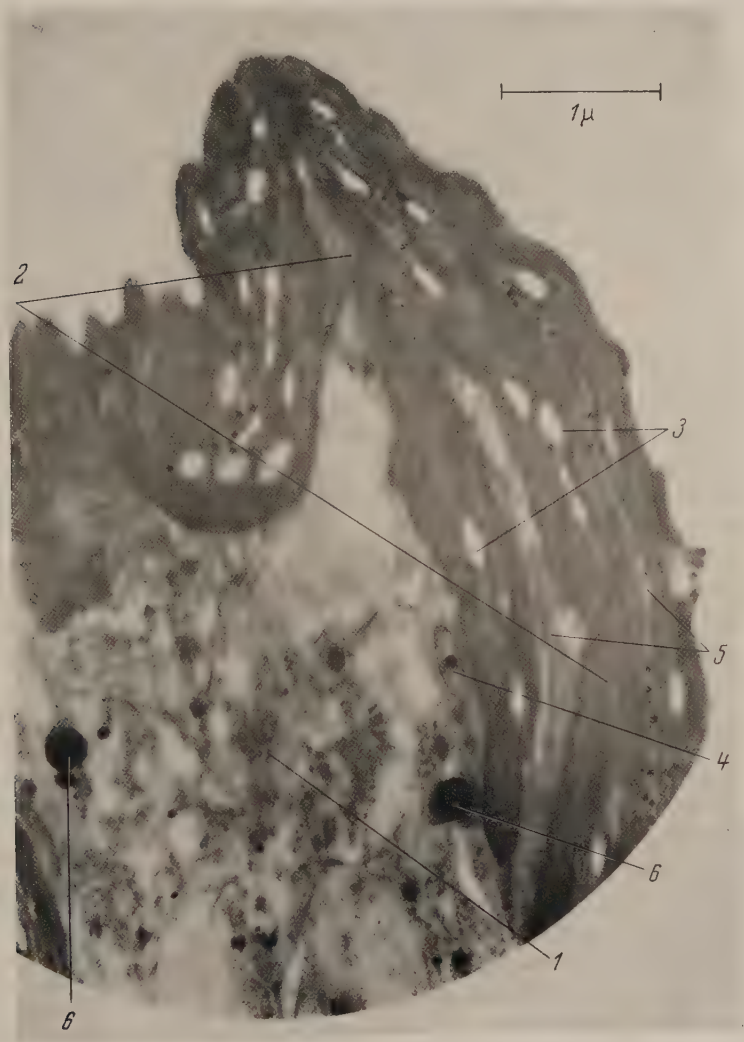


Abb. 3. *Rhopalocystis oleifera*. Fragment eines schiefen Längsschnittes. Vergrößerung 23000 $\times$ .  
 1 Cytoplasma, 2 Plastide, 3 Stromastärke, 4 Mitochondrion, 5 stromatische Zwischensubstanz in der  
 Plastide, mit osmiophilen Granulis, 6 Metaphosphat. (Aufnahme Dr. NIKLOWITZ)

der Lamellen hat auch u.a. MANTON (1955) in den Plastiden von *Synura caroliniana* nachgewiesen. Auch bei *Rhopalocystis* beträgt die Dicke der Laminae etwa 100 Å.

Nach außen hin, d. h. gegen die Innenfläche der Zellmembran zu, erscheint die Abgrenzung der Plastiden nicht ganz scharf; eine deutlich ausdifferenzierte Plastidenmembran tritt in den vorliegenden elektronenmikroskopischen Bildern nicht in Erscheinung. Dagegen zeigt Abb. 1 und Abb. 2, 6 einen schmalen globulären Saum an der Peripherie des Chloroplasten, den man mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit als das Peristromium ansehen darf. An dieses Peristromium grenzen unmittelbar die äußeren Lamellen der Plastiden an. Grana sind nicht vorhanden, in Übereinstimmung mit der Mehrzahl der bisherigen Befunde an Algenchromatophoren, von denen die von *Spirogyra* eine Ausnahme machen (BUTTERFASS 1957). Der Chloroplast zeigt eine flächenparallele Laminarstruktur, die weitgehend dem Prinzip eines idealen Wienerischen Schichtenmischkörpers entspricht. Die Algenchromatophoren besitzen somit im allgemeinen eine primitivere Feinstruktur als die der höheren Pflanzen. Die Granabildung bei den letzteren darf als eine sekundäre, evolutive Ausdifferenzierung innerhalb des Plastidenkörpers der Blütenpflanzen aufgefaßt werden. Ein weiterer Unterschied besteht ferner darin, daß die genetische Kontinuität der Plastiden bei den Algen, sowohl im somatischen als auch im reproduktiven Anteil derselben, gewahrt ist. Die Vermehrung der Algenplastiden erfolgt von den embryonalen Stadien (Schwärmzellen, Gameten, Eizellen, Cysten usw.) an durch Reduplikation. Proplastiden sind bei Algen bisher nicht festgestellt worden, da auch in den Zellen der Vegetationspunkte stets reduplikationsfähige Plastiden von Anfang an vorhanden sind<sup>1</sup>. Diesen Feststellungen darf wohl eine phylogenetische Bedeutung zugesprochen werden.

In Abb. 1, 4 ist ferner das Pyrenoid, umgeben von großen Lacunen sichtbar, welche die Stellen anzeigen, wo sich die Stärkekalotten befinden haben (Abb. 1, 6). Unmittelbar an die Stärkehülle grenzt eine in der Breite schwankende Stromaschicht, in welcher auch wieder die oben erwähnten osmiophilen Granula enthalten sind. Erst dann folgen die Lamellen, die dem Pyrenoid ausweichen. Das Innere des Pyrenoids, der Pyrenophor, zeigt keine laminare Struktur, sondern eine ähnliche Beschaffenheit wie das Stroma. Im ersten Augenblick würde man von einer globulären Struktur sprechen, bei genauerem Zusehen jedoch gewahrt man, daß die Pyrenophorsubstanz von ganz zarten Fibrillen durchzogen ist. Diese haben mit den Lamellen der Plastide nichts zu tun, obwohl es mitunter vorkommt, daß einzelne Lamellen den Pyrenophor durchziehen. Soweit die relativ schwache Vergrößerung der Abb. 1 es gestattet, ist man geneigt, diese Fibrillen etwa mit den Cytonemata von STRUGGER in Vergleich zu ziehen. In einigen Aufnahmen traten weiterhin Strukturen in Erscheinung, wie sie SAGER u. PALADE (1954) für die

<sup>1</sup> BUTTERFASS (1957) versucht die Karyoide von *Spirogyra* mit dem Primärgranum der Angiospermen in Beziehung zu bringen.



Pyrenoide von *Chlamydomonas reinhardi* beschrieben und als „pyrenoid tubuli“ bezeichnet haben. In den mir verfügbaren Präparaten waren diese Strukturen zu selten, um allgemeine Schlüsse daraus ziehen zu können. Sie sollen hier, der Vollständigkeit halber, nur registriert werden.

Nach dem hier Gesagten handelt es sich um einen nicht-laminaten Pyrenophor, dessen Substanz wahrscheinlich mit der des Stromas identisch sein dürfte. Die Pyrenophor-Substanz erscheint jedoch etwas dichter als die des Stromas und des Peristromiums und dürfte aller Wahrscheinlichkeit nach keine globuläre sondern eine fibrilläre Textur haben. Abgesehen von diesem letzteren Umstande stimmt das elektronenmikroskopische Bild des Pyrenoids von *Rhopalocystis* weitgehend mit dem von *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Enteromorpha* und *Cladophora* überein. Hingegen scheinen die Pyrenoide der Conjugaten (*Spirogyra*, *Closterium*) nach LEYON (1954) und kürzlich auch nach BUTTERFASS (1957) eine laminate Substruktur zu besitzen. Ähnliches geben auch WOLKEN u. PALADE (1953) für die Pyrenophoren von *Euglena* an. Sollten diese Unterschiede, auf breiterer Basis ermittelt, eine Bestätigung finden, so läge darin ein Merkmal vor, welches systematisch gewertet werden könnte.

Die in Abb. 1, 8 sichtbaren dunklen Körper stellen Metaphosphate dar, welche in den Zellen von *Rhopalocystis* in reichen Mengen vorhanden sind. Die Aufhellungen im Metaphosphatkörper neben dem Pyrenoid entstehen infolge Sublimierung bei stärkerer und längerer Durchstrahlung. Bei länger andauernder Beobachtung kann die Substanz bis auf einen scharf gezeichneten Ring verschwinden.

Die dieser Veröffentlichung beigelegten Abbildungen sind auch deswegen von Interesse, weil sie noch 2 weitere Zellbestandteile, nämlich den Kern und die Mitochondrien, zeigen. Letztere sind namentlich in dem Cytoplasmabezirk zwischen den Chromatophorenlappen, unterhalb des Zellkerns, sichtbar (Abb. 1, 7). Aus den cytochemischen Untersuchungen ist bekannt, daß sich die Mitochondrien in größerer Zahl auch um den Kern lagern. Dies stimmt mit dem vorliegenden elektronenmikroskopischen Bild gut überein. Sie liegen aber auch in dem cytoplasmatischen Raum unterhalb des Pyrenoids (Abb. 1, 7). Schon bei 33 000 facher Vergrößerung ist zu erkennen, daß die Mitochondrien eine längliche Gestalt, mit verjüngten Enden, haben. Die Größe schwankt zwischen 400—800 m $\mu$  in der Länge und 40—50 m $\mu$  in der Breite, was mit den Befunden im Lichtmikroskop, nach Färbung mit Janusgrün, übereinstimmt. Bei stärkerer Vergrößerung (Abb. 2, 3) ist eine einkonturige Membran deutlich zu erkennen. Im Innern des Mitochondrions nimmt man eine Längsstruktur wahr, die offenbar aus längsgerichteten, doppelkonturigen Balken besteht. Nicht selten ist ungefähr in der Mitte ein dunkles Korn sichtbar,

über dessen Bedeutung im Augenblick nichts ausgesagt werden kann. An 2 Stellen der Abb. 1, 7' u. 7'' sind hantelförmige Figuren sichtbar, die offenbar Teilungsstadien von Mitochondrien vorstellen.

Die Längsorientierung der Balken (microvilli) oder Röhren? (tubuli?) dürfte für pflanzliche Mitochondrien charakteristisch sein. Letztthin haben GREENWOOD, MANTON u. CLARKE (1957) auch für die Mitochondrien in den Synzoosporen von *Vaucheria* eine ähnliche Feinstruktur elektronenoptisch festgestellt. Es darf daher, vergleichsweise, darauf hingewiesen werden, daß bisher nur bei *Euglena* Mitochondrien von tierischem Typus, d. h. mit quergestellten cristae, vorgefunden wurden (WOLKEN u. PALADE 1953). Die Euglenomonadinen nehmen auch sonst eine Sonderstellung im System der Protophyten ein. Eine Vergrößerung der aktiven Oberflächen innerhalb des Mitochondrions wird aber so und so erreicht.

Der Zellkern, der in der lebenden Zelle bei gewöhnlichem und bei Phakolicht als ein scharf umgrenztes kugeliges Gebilde in Erscheinung tritt, hat, wie aus Abb. 1, 3 und 2, 2 ersichtlich, bei der Präparation für die elektronenmikroskopische Aufnahme merkbare Deformationen erlitten. In unserem Bilde tritt er uns als ein langgestrecktes Gebilde entgegen, welches auf der linken Seite eine tiefe Einkerbung (Abb. 1, 3') aufweist und dessen unteres Ende schnabelförmig vorgezogen ist (Abb. 1, 3''). Dieser Fortsatz wird zu beiden Seiten von den Mitochondrien flankiert (Abb. 1, 7 u. 2, 3). In beiden Abbildungen, deutlicher noch in Abb. 2, läßt sich die doppeltkonturierte Kernmembran erkennen. Im Augenblick der Fixierung befand sich dieser Kern in der interkinetischen Phase, woraus sich seine gleichmäßige leptonische Strukturierung erklärt. Im ersten Aspekt gewinnt man den Eindruck einer granulären Struktur, doch bei genauerer Betrachtung stellt man fest, daß es sich um ein dichtes Knäuel feinsten Fibrillen handelt, deren gewundener Verlauf stellenweise deutlich hervortritt. Diese Fibrillen zeigen eine molekulare Sequenz und ihr paralleler Verlauf ist an vielen Stellen zu erkennen. Ob es sich hier um die stark entnucleinisierten Chromonemata des Ruhekernes handelt, wage ich nicht zu entscheiden. Fest steht jedoch, daß der Kern eine fibrilläre Substruktur aufweist, die vielleicht, größenordnungsmäßig, unterhalb der Meßgrenze der lichtoptisch sichtbaren Chromonemata liegt. Diese äußerst zarte, und nur bei elektronenoptischer Vergrößerung sichtbar werdende Feinstruktur erklärt auch, daß der Ruhekern im Lichtmikroskop „optisch leer“ erscheint.

### Zusammenfassung

Die Plastiden von *Rhopalocystis oleifera* lassen im elektronenmikroskopischen Bild, wie bei allen bisher untersuchten Euehlorophyceen, eine laminate Struktur erkennen. Die Substanz des Pyrenophors weist

hingegen eine fibrilläre Textur auf. Außerdem wird noch die submikroskopische Struktur der Mitochondrien und des Ruhekernes kurz besprochen.

### Literatur

- ALBERTSSON, P. A., and H. LEYON: The structure of chloroplasts V. *Chlorella pyrenoidosa* Pringsheim studied by means of electron microscopy. *Exp. Cell Res.* **7**, 288—290 (1954). — BUTTERFASS, TH.: Über Grana, Karyoide und Pyrenoide von *Spirogyra*, *Protoplasma* **48**, 368—381 (1957). — FREY-WYSSLING, A.: Die submikroskopische Struktur des Cytoplasmas. *Protoplasmatologia* **2**, A2, (1955). — GRANICK, S.: Plastid structure, development and inheritance. *Handb. d. Pflanzenphysiol.* **1**, 507—564 (1955). — GREENWOOD, A. D., I. MANTON and B. CLARKE: Observations on the structure of the Zoospores of *Vaucheria*. *J. Exp. Bot.* **8**, 71—86 (1957). — LEYON, H.: The structure of chloroplasts III. A study of pyrenoids. *Exp. Cell Res.* **6**, 497—505 (1954). — MANTON, I.: Observations with the electron microscope on *Synura caroliniana* Whitford. *Proc. Leeds Philos. Soc.* **6**, V, 306—316 (1955). — MÜHLETHALER, K.: Submikroskopische Morphologie, *Fortschr. d. Bot.* **19**, 38—45 (1957). — SAGER, R., and G. E. PALADE: Chloroplast structure in green and yellow strains of *Chlamydomonas*. *Exp. Cell Res.* **7**, No. 2, 584—588 (1954). — SCHUSSNIG, B.: Eine neue Protococcalen-Gattung, *Österr. Bot. Zschr.* **102**, 444—459 (1955). — STEFFEN, C., and F. WALTER: Licht- und elektronenoptische Untersuchungen über den Feinbau des Chromatophors von *Ankistrodesmus braunii*. *Planta* **45** (1955). — WOLKEN, J. J., and G. E. PALADE: An electron microscope study of two flagellates. Chloroplast structure and variation. *Ann. New York Acad. Sci.* **56**, 873—888 (1953).



(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Göttingen)

## Physiologische und genetische Untersuchungen über die Fruchtkörperbildung bei *Schizophyllum commune* \*

Von

CLAUS JÜRGENS

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 1. Juni 1958)

Die bei den Untersuchungen der Fruchtkörperbildung von Hymenomyceten auftretenden Schwierigkeiten liegen genetisch an der Kleinheit der Kerne und Chromosomen und dem Mangel auffälliger morphologischer Merkmale sowie in der arbeitstechnischen Erschwerung, daß durch die vorwiegend haplogenotypisch tetrapolare Bestimmung und Vererbung des Geschlechts die Möglichkeit, zwei bestimmte Haplonten miteinander zu kreuzen, stark eingeschränkt wird. Hinzu kommt die physiologische Schwierigkeit, daß das Paarkernmycel selten oder doch unregelmäßig Fruchtkörper bildet und daß diese, wenn sie auftreten, in den meisten Fällen abnorm in Gestalt, Größe, Farbe und Funktion sind.

Die Bedingungen der Fruchtkörperbildung höherer Pilze sind Gegenstand zahlreicher Arbeiten gewesen, deren Schwergewicht wohl im Anschluß an KLEBS (1900) immer auf einer Untersuchung des Einflusses der Umweltfaktoren gelegen hat. Soweit sich die mannigfaltigen Ergebnisse (Zusammenstellung bei BAVENDAMM 1939) überhaupt unter einem einheitlichen Gesichtspunkt zusammenfassen lassen, kann gesagt werden, daß unter den Außenbedingungen das Licht die größte Rolle spielt (BREFELD 1889; MÜNCH 1909; LONG u. HARSCH 1918; SCHENCK 1919; BORRIS 1934 u. a.). Dabei darf aber nicht übersehen werden, daß sich die Wirkung des Lichtes in der Regel darauf beschränkt, bei Stämmen, die die durchaus nicht verbreitete Fähigkeit besitzen, in Reinkulturen bereits abnorm zu fruktifizieren, die Ausbildung normal gestalteter, funktionstüchtiger Fruchtkörper zu ermöglichen (BULLER 1905, 1906; FALCK 1909, 1923 u. a.). Wie ist aber die vielen Mykologen geläufige Erfahrung zu deuten, daß gewisse Kombinationen verträglicher Einspormycelien grundsätzlich nicht fruktifizieren und daß es unmöglich ist, durch noch so günstige Außenbedingungen<sup>1</sup> dieses Verhalten entscheidend zu beeinflussen?

WAKEFIELD (1909) war die erste, die (für *Schizophyllum commune* u. a.) individuelle, erbliche Verschiedenheiten bezüglich der Neigung oder Disposition zur Fruchtkörperbildung und das Bestehen fertiler und steriler Stämme wahrscheinlich machte; sie vermutete, daß es sich dabei um „physiologische Rassen“ handele.

\* Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Göttingen.

<sup>1</sup> LILLY u. BARNETT (1951) geben eine Zusammenstellung von 26 die Sporenbildung auslösenden oder steigernden Faktoren. Trotzdem muß man damit rechnen, daß bei manchen Objekten alle versagen.

Vorwiegend an dem gleichen Objekt hat dann KNIPE (1923, 1928) im Zusammenhang mit seinen Untersuchungen über die Geschlechtsvererbung die Ansicht geäußert, daß das Zustandekommen der Fruchtkörperbildung außer von notwendigen Außenbedingungen von Gegenwart und Wirksamkeit ganz bestimmter Gene abhängig sei, deren Erblichkeitsverhältnisse allerdings verwickelt lägen. Nach den experimentellen Bestätigungen von ZATTLER (1924) an *Schizophyllum commune* und *Collybia velutipes* und BRUNSWIK (1924) an *Coprinus ephemerus* hat KNIPE (1929, 1930) seine Vorstellungen dahingehend vertiefen können, daß das Entstehen eines Fruchtkörpers das Zusammenwirken mehrerer, von den Geschlechtsgenen verschiedener Gene im Sinne einer additiven Polygenie zur Voraussetzung habe. Auch HARDERS (1927) Untersuchungen weisen auf die Abhängigkeit der Fruchtkörperbildung vom Genotypus hin. Da nach der Kenntnis des Verfassers seit jener Zeit, abgesehen von einer kleineren Arbeit (BARNETT u. LILLY 1949), in genetischer Richtung nichts erschienen ist, steht eine Erbanalyse der inneren Bedingungen der Fruchtkörperbildung bis heute aus. Die Fruchtkörperbildung an sich ist vor allem der Unmöglichkeit wegen, von einer nicht fruktifizierenden Paarung Nachkommen zu erhalten, einer genetischen Untersuchung ebenfalls schwer zugänglich.

In der vorliegenden Arbeit wird versucht, zu diesen Fragen einen Beitrag zu leisten.

## I. Material und Methode

### 1. Ausgangsmaterial

Als Versuchsobjekt wurde *Schizophyllum commune* Fries gewählt, der in Reinkultur bei Anspruchslosigkeit an das gebotene Substrat nach kurzer Zeit in verhältnismäßig kleinen Kulturgefäßen leicht zahlreiche, normal gestaltete, fertile Fruchtkörper bildet, deren Sporen unschwer keimen. Auch die von EHRLICH u. McDONOUGH (1949) mit drei Chromosomen im Genom festgestellte Chromosomenzahl ist wünschenswert klein. Diesen Vorzügen als Versuchspilz stehen die Schwierigkeiten gegenüber, die die winzigen ( $6-7 \times 2-2,5 \mu$  nach ENGLER 1928 sowie WAKEFIELD u. DENNIS), glatten, hyalinen Sporen einer Tetradenanalyse entgegensetzen: bei *Schizophyllum* versagen alle bisherigen Verfahren bis auf ein umständliches nach PAPAZIAN (1950a), das eine Trennung der Sporen erst nach ihrer Keimung erlaubt. Da außerdem der Gang dieser Arbeit es mit sich brachte, daß zu Beginn der genetischen Versuche bereits eine größere Anzahl ungeordneter Haplonten zur Verfügung stand, wurde auf die Vorteile einer Tetradenanalyse verzichtet.

Bekannt wurde *Schizophyllum* vor allem durch KNIPE (1920, 1922, 1923, 1928, 1929) Entdeckung der multipolaren Sexualität und deren Erklärung durch zwei in verschiedenen Chromosomen lokalisierte Reihen multipler Inkompatibilitätsallele. Die Kernabhängigkeit der eigentümlichen Hemmungserscheinungen zwischen gewissen Einspormycelien (HARDER 1927) vermochte PAPAZIAN (1949, 1950b, 1951) durch den genauen Zusammenhang der kopulationsbedingenden (= geschlechtsbestimmenden) Faktoren mit charakteristischen Heterokaryons an *Schizophyllum* aufzuklären (siehe S. 414f.) und ebenso wie RAPER u. SAN ANTONIO (1952, 1954) einige morphologische, physiologische und biochemische Mutanten zu finden. Die für die vorliegenden Untersuchungen wichtigste Arbeit ist jedoch die von ZATTLER (1924), in der bei *Schizophyllum* die Bildung abnormer Knäuelfruchtkörper aus pseudoparenchymatischem Hyphengeflecht, die zwar keine Lamellen aber doch typische viersporige Basidien tragen, auf einen unabhängig von den Geschlechtstypen spaltenden, rezessiven Mendelfaktor zurückgeführt wird; das dominante Wildallel bedingt in homo- und heterozygoter Kombination völlig normale Fruchtkörperbildung. Damit wurde erstmals ein bestimmtes Gen für die Fruchtkörperbildung an sich nachgewiesen.

Als Ausgangsmaterial dienten ein Schnallenmycel und Fruchtkörper verschiedener Standorte. Aus der folgenden Übersicht sind ihre Herkunft, die Bezeichnungen der davon abgeleiteten Stämme von Einspormycelien sowie die ihnen willkürlich zugeschriebenen Erbformeln bezüglich der Geschlechtsallele ersichtlich:

Herkunft	Bezeichnung	Geschlechts-genotyp <sup>1</sup>
Schnallenmycel aus dem Centraalbureau voor Schimmelcultures in Baarn, Holland (C. B. S.) (KNIEP)	<i>Ba</i>	$A^1/A^2; B^1/B^2$
Fruchtkörper aus der Nähe Stuttgarts	<i>St</i>	$A^3/A^4; B^3/B^4$
Fruchtkörper aus dem Hainberg bei Göttingen	<i>Hb</i>	—
Fruchtkörper aus Wiesensteig (Württ.), 3—4 cm ø	<i>Wi</i>	$A^5/A^6; B^5/B^6$
Fruchtkörper aus Wiesensteig (Württ.), jedoch ø sehr klein	<i>Ws</i>	—

Für die Untersuchungen wurden vorwiegend die Stämme *Ba* und *St* herangezogen.

## 2. Methode

Da die Fruchtkörper die Basidiosporen im allgemeinen steril abschießen, können die Einspormycelien mittels 4% iger Malzextrakt<sup>2</sup>-Gelatineplatten leicht isoliert und bereits nach 14 Tagen in 5% igen Malzextrakt-Agarschrägröhrchen (1,5% Agar) paarweise untereinander kombiniert werden<sup>3</sup>. Nach abermals 14 Tagen kann dann die mikroskopische Prüfung auf Schnallen erfolgen, dem äußeren Kennzeichen für die stattgefundene Kopulation (Plasmogamie) und Herstellung der Paarkernphase, worauf von den schnallenträgenden, sogenannten +(plus)-Kombinationen (bei einem tetrapolaren Vertreter wie *Schizophyllum* theoretisch 25%) Fruchtkörperkulturen angelegt werden. Dies geschah in 100 ml Erlenmeyerkolben, in denen 25 ml autoklavierter Malzagar (Konz. siehe oben) schräg so erstarrt war, daß eine annähernd lotrechte Kulturoberfläche entstand (Abb. 4, 6, 7). Als Verschuß dienten Stopfen aus ungebleichtem Zellstoff. Beim Beimpfen der Kolben dürfen auf keinen Fall Fruchtkörperanlagen oder gar Sporen übertragen werden, was wohl geschehen kann, wenn Mycelien schon fruktifizieren, bevor sie überall den Rand des Kombinationsröhrchens erreicht haben (Stamm *Ba*). Mit Rücksicht auf die für die Schnallenprüfung rückständigen Kombinationen wurde dann zwar auf eine vorzeitige Abimpfung verzichtet, jedoch dafür gesorgt, daß die Röhrchen senkrecht in Bechergläsern aufbewahrt und die Impfstücke am oberen Rande entnommen wurden (letzteres noch aus einem anderen Grund: siehe S. 400). Wenn im folgenden

<sup>1</sup> In dieser Arbeit erfolgt die Verwendung von Gensymbolen sowie die Bezeichnung der Mutanten nach der in der *Drosophila*-Genetik üblichen Praxis. — KNIEPS Erbformel AaBb täuscht Dominanzverhältnisse vor. — Ausdrücke wie „Homo- und Heterozygotie“ (obgleich keine Zygote vorausgegangen ist) werden im erweiterten Sinne auf die Paarkernphase angewandt.

<sup>2</sup> „Biomalz“, Kirner Vitaborn Werk G.m.b.H., Kirn an der Nahe.

<sup>3</sup> Die Testkreuzung mit den vier Geschlechtstypen der p-Haplonten des betreffenden oder bei Stammkreuzungen eines der Ausgangsstämme mit anschließender Paarung der jeweils verträglichen Einspormycelien bedeutet zwar eine Arbeitsersparnis, dafür aber den doppelten Zeitaufwand (und wäre bei der Schnallenbildung der Fs/Fs-Paarung [vgl. S. 400, 406; Tab. 5, 7] unter Umständen auf Schwierigkeiten gestoßen).



nicht anders angegeben, standen die Kulturen bei einer Zimmertemperatur von  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , die Schräglfläche dem mehrere Meter entfernten Südfenster zugewandt. Solange das Mycel noch über die Agaroberfläche hinwegwächst, tritt der gleichermaßen für Einspor- wie Schnallenmycelien aller Stämme von *Schizophyllum* kennzeichnende unangenehme Geruch auf, den BIRKINSHAW, FINDLAY u. WEBB (1942) darauf zurückführen, daß Sulfat zu Methylmerkaptan reduziert wird.

Da sich in Vorversuchen zeigte, daß bei *Schizophyllum* die Zusammensetzung des Nährbodens wenig Einfluß auf die Fruchtkörperbildung ausübt, wurde von dem von ZATTLER (1924) benutzten Brotnährboden abgegangen, einmal weil auf ihm die Fruktifikation langsamer erfolgt und das Brot dabei schneller austrocknet, zum anderen weil die häufig unter dem Substrat (Stamm *Ba*) einsetzende und dann gehemmte Bildung von Fruchtkörpern sich schwer beurteilen läßt.

Stämme wie *St*<sub>16</sub> und *Ba*<sub>15</sub>, die nach ihrem geschlechtlichen Verhalten entweder Mischmycelien oder Halbmutanten darstellen, wurden von den Untersuchungen ausgeschlossen. Hinsichtlich der zu einer Unterscheidung erforderlichen genetischen Prüfung siehe KNIEP (1923, 1928) oder ZATTLER (1924). Die Stammkulturen wurden alle zwei Monate übergeimpft.

Die Bezeichnung der Generationen soll in Übereinstimmung mit KNIEP (1929, 1930) erfolgen:

P-Generation = dikaryotische Elterngeneration;

p-Generation = die aus P-Fruchtkörpern hervorgegangenen Haplonten;

F<sub>1</sub>-Generation = erste dikaryotische Tochtergeneration, entstanden durch Kopulation zweier p-Haplonten;

f<sub>1</sub>-Generation = haploide Nachkommenschaft von F<sub>1</sub> usw.

Wie bei ZATTLER (1924) werden Einspormycelien (*Ba*<sub>1</sub>) sowie Kombinationen und Kreuzungen zwischen ihnen (*Ba*<sub>1</sub> × *Ba*<sub>6</sub> = *Ba*<sub>1×6</sub>) zunächst durch Fußzahlen bezeichnet. Schnallenmycelien, aus denen eine weitere Generation abgeleitet werden soll, bekommen fortlaufend zu der Bezeichnung des Stammes eine Vorzahl (*Ba*<sub>1×6</sub> = 1*Ba*; *Ba*<sub>6</sub> × *St*<sub>5</sub> = 1*BaSt*), ihre haploide Nachkommenschaft wieder Fußzahlen (1*Ba*<sub>1</sub>; 1*BaSt*<sub>1</sub>) usw.

Als Ausgangsfruchtkörper der jeweils nächsten Generation dienten die zwar kleinen aber derben Fruchtkörper der Starklichtkulturen, die im Verhältnis zu ihrer Größe die meisten Lamellen besitzen.

Bei den Versuchen mit Kunstlicht erhielten je vier Parallelkolben auf halbkreisförmig angeordneten Rängen Dauerlicht verschiedener abgestufter Beleuchtungsstärken<sup>1</sup> mittels einer durch fließendes Wasser gekühlten 500 Watt Osram Wolframlampe. Vorher wurden gleich große Impfstücke hinter dem Rand eines vegetativen Mycels aus einer Petrischale entnommen und diesen in sechstägigem Dauerdunkel ein gleichmäßiges Angehen ermöglicht. Als Maß für die Stärke der Fruchtkörperbildung, in die die Schnelligkeit der Fruchtkörperentwicklung, Zahl und Größe der Fruchtkörper (bzw. Anlagen) sowie hier der überwiegende Fruchtkörpertyp eingehen, soll das Trockengewicht dienen, dessen Bestimmung auch nach PLUNKETT (1953) vorzuziehen ist. Wenn nach etwa 4 Wochen die ersten Autolyseerscheinungen auftraten, wurden jeweils alle Fruchtkörper eines Kolbens gleich dicht über

<sup>1</sup> Beleuchtungsstärke gemessen an der Kulturoberfläche mit Fotozelle der Fa. Dr. B. Lange, Berlin-Dahlem; Meßgerät AEG.

der Substratoberfläche abgeschnitten, im Trockenschrank bei 100°C bis zur Konstanz getrocknet und dann auf das volle Milligramm ausgewogen. Als Eintritt der Fruchtkörperbildung wurde angesehen, wenn in der Hälfte der Parallelkolben die Normalfruchtkörperanlagen 1 mm groß, die Geweihfruchtkörper aber fingerförmig waren und  $\frac{1}{2}$  cm maßen: letzteres war notwendig, um sie von sonstigen, gerade bei geringen Beleuchtungsstärken auftretenden Mycelwucherungen zu unterscheiden. Traten in einer Kultur mehrere Fruchtkörpertypen auf, so wurde nur die am stärksten ausdifferenzierte Form in die Tabellen aufgenommen.

Das von PAPAŽIAN (1949, 1950b, 1951) für *Schizophyllum* ausgearbeitete Verfahren zur Bestimmung des Geschlechtstyps der Haplonten wird S. 414f. angewendet und kritisch erläutert.

## II. Physiologische Versuche und ihre Deutung

### 1. Abnorme Geweihfruchtkörper

Die Untersuchungen gingen von der Feststellung aus, daß die von 17 Einspormycelien des Stammes *St* gewonnenen 34 verschiedenen +-Kombinationen der  $F_1$  sowie eine Massenkultur in keinem Falle normal fruktifizierten, obgleich der Ausgangsfruchtkörper gut entwickelt war und die p-Haplonten ein reines Viererschema zeigten. An Stelle normal



Abb. 1. Fruchtkörpertypen von *Schizophyllum commune*. Links Geweihfruchtkörper fortschreitender Ausbildung aus +/+ -Schwachlichtkulturen (*St*  $\times$  *St*). Rechts, obere Reihe spitzfächerige, untere rundfächerige Normalfruchtkörper; jeweils von links nach rechts Geweihfruchtkörper mit nachträglich normaler Spitze (HN), +/+ -Fruchtkörper aus der Kultur (größer) und aus dem Freien

gestalteter Fruchtkörper traten im Laufe von 2—3 Wochen in fast allen Paarungen zunächst klumpige oder fingerförmige Mycelwucherungen auf, von denen sich letztere in etwa der Hälfte der Kulturen zu 2—3 cm großen, aufrechten, hirschgeweihartigen Gebilden entwickelten (vgl.

Abb.1 links sowie Abb.4 Mitte). Sie hatten auch nicht das feste, weiß-graue oder gelbbraune Aussehen der Normalfruchtkörper, sondern ihre Oberfläche war locker von weißen Hyphen umkleidet. Da diese Gebilde weder ein Hymenium noch irgendeine Art von Sporen bildeten und mikroskopisch ein prosenchymatisches Hyphengeflecht (Abb.2) zeigten, waren sie also etwas ganz anderes als Normalfruchtkörper und auch ZATTLERS Knäuelfruchtkörper, die beide aus pseudoparenchymatischem Plektenchym (Abb.3) bestehen und fertil, ihnen also nicht analog sind.

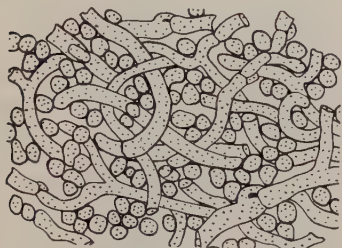


Abb. 2. Querschnitt durch das prosenchymatische Hyphengeflecht eines  $+/+-$ -Geweihsfruchtkörpers ( $St_2 \times 14$ )



Abb. 3. Querschnitt durch den „Stiel“ eines  $Fs/+$ -Normalfruchtkörpers ( $Ba \times Ba$ ); pseudoparenchymatisch verflochtene Hyphen mit verdickten Zellwänden

Nach einer weiteren Woche fielen in drei Paarungen, nämlich  $St_{3 \times 14}$ ,  $St_{7 \times 15}$  und  $St_{14 \times 15}$ , die Spitzen dieser Gebilde durch typisch graugelb gefärbte und kurz „behaarte“ Normalfruchtkörperanlagen auf, die sich zu etwa 2 cm großen, normal gestalteten und Sporen streuenden Fruchtkörpern weiterentwickelten. Damit verhielt sich der Stamm *St* so, wie es ZATTLER (1924) in nur einem und weniger ausgeprägten Fall von seinem Stamm *Spe* nebenbei erwähnt. Die beiden übrigen Arbeiten, die sich mit diesen Geweihformen beschäftigen, gehen schon auf eine Erörterung und den Versuch einer Erklärung ein: WAKEFIELD (1909), die diese Gebilde in Dunkelkulturen beobachtete und durch nachträgliche Beleuchtung Fruchtkörperanlagen erzielte, meint, *Schizophyllum* brauche zur normalen Fruchtkörperbildung eine bestimmte, verhältnismäßig große Lichtmenge, die bereits im Inneren eines Raumes nicht erreicht werde. Dagegen nehmen SCHOPFER u. BLUMER (1940) an, daß die Geweihformen durch einen synthetischen Nährboden (Glucose-Asparagin) bedingt würden, dem unbekannte, für eine normale Fruchtkörperbildung erforderliche Substanzen fehlten, die in natürlichen Medien enthalten seien und deren Bildung nicht durch die Gegenwart von Vitamin  $B_1$  allein ermöglicht werde<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Hinsichtlich der Vitamin  $B_1$ - bzw. Pyrimidin-Auxotrophie von *Schizophyllum* vergleiche ROBBINS u. KAVANAGH (1938) sowie ROBBINS (1938).



Angesichts dieser Widersprüche erheben sich zwei Fragen:

1. Welche inneren und äußeren Bedingungen sind für die Entstehung der geweihartigen Gebilde verantwortlich, und wie läßt sich eine normale Fruchtkörperbildung hervorrufen?

2. Sind die geweihartigen Gebilde normalen Fruchtkörpern homolog?

Die Möglichkeit, daß die bei Hymenomyceten häufig zu beobachtende starke Variabilität in der Gestaltung der Fruchtkörper erblich bedingt sei, darf nicht von

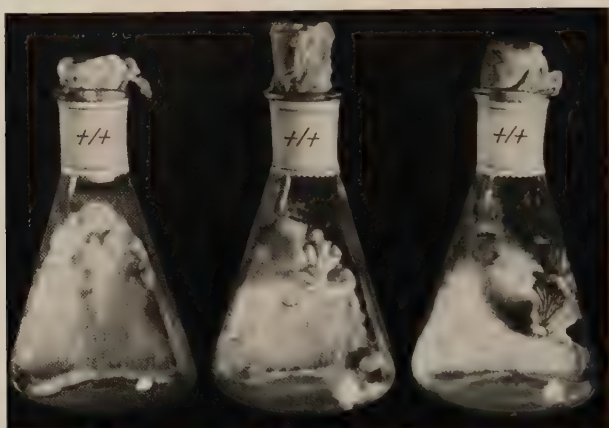


Abb. 4. Fruchtkörperbildung einer  $+/+$ -Paarung ( $St_{8 \times 18}$ ) im — von links nach rechts — Dunkeln, Schwachlicht und Starklicht

vornherein ausgeschlossen werden, um so weniger als ZÄTZLER (1924) bei *Schizophyllum* die Knäuelfruchtkörper in der Paarkernphase und BRUNSWIK (1924) bei *Coprinus ephemerus* die koralloiden Haplofruchtkörper auf mendelnde Erbanlagen zurückführen konnten; doch sollen zunächst die bisherigen Angaben überprüft werden.

Von den aus den p-Einspormycelien von *St* hervorgegangenen  $34+$ -Kombinationen wurden je drei Parallelkolben beimpft, worauf sofort einer in einem großen Dunkelschrank kein Licht („Dunkelkulturen“), ein zweiter in einem 5 m vom Fenster eines Südzimmers entfernten Wandgestell nur Streulicht („Schwachlichtkulturen“) und der dritte auf einem unmittelbar hinter den Doppelscheiben eines Südfensters angebrachten Drahtglasgestell zeitweilig direktes Sonnenlicht erhielt („Starklichtkulturen“). Bei letzteren erreichte an sonnigen Tagen die Beleuchtungsstärke an der Agarschrägfläche 30 000 Lux, das ist das einhundertfache der Schwachlichtkulturen, an ganz trüben Tagen dagegen mit etwa 1000 Lux immer noch das zwanzigfache. Nach fünf Wochen lag folgendes Ergebnis (Abb. 4) vor:

Die Dunkelkulturen zeigten das stärkste vegetative Wachstum und fielen durch starkes, rein weißes, wattiges Luftmycel sofort auf; in fast

allen Kolben bildeten sich höchstens klumpige Mycelwucherungen, deren Oberfläche häufig von Guttationstropfen besetzt war.

In den Schwachlichtkulturen traten die oben beschriebenen gewiehartigen Gebilde und an diesen in drei Fällen normale Fruchtkörper auf<sup>1</sup>.

In fast allen Starklichtkulturen (6 Ausnahmen von 34) war schon nach 2—3 Wochen die Bildung normaler Fruchtkörper abgeschlossen, wobei diese meist unmittelbar dem Substrat aufsaßen, in 6 Fällen sich aber auch an den Spitzen zunächst entstandener gewiehartiger Gebilde ausbreiteten (Übersicht in Tab.1).

Dunkel- und Schwachlichtkulturen, die nach 5 Wochen nachträglich dem Starklicht ausgesetzt wurden, vermochten trotz des erschöpfen und ausgetrockneten Nährbodens übereinstimmend mit den entsprechenden Starklichtkulturen normal zu fruktifizieren, indem entweder Fruchtkörper neu angelegt oder die Geweihformen zu solchen ausgebildet wurden.

Abgesehen davon, daß in den Dunkelkulturen keine Geweihformen auftraten<sup>2</sup>, stellen diese Ergebnisse eine genaue Überprüfung und Bestätigung dessen dar, was WAKEFIELD (1909) andeutete. Dagegen ließen sich die Feststellungen von SCHOPFER u. BLUMER (1940) nicht bestätigen, indem sich zeigte, daß sowohl auf rein synthetischem Nährboden (Glukose-Ammoniumtartrat + B<sub>1</sub>) im Starklicht normale Fruchtkörper als auch auf künstlichen komplexen (Malzextrakt, Brot) und natürlichen Substraten (Holz) im Schwachlicht Geweihformen erhalten wurden. In zahlreichen Versuchen erwies sich die Bildung von Normalfruchtkörpern oder Geweihformen als unabhängig von verschiedenen C-Quellen (Glukose, Rohrzucker, Stärke, Cellulose), N-Quellen (KNO<sub>3</sub>, Ammoniumtartrat, Alanin, Asparagin, Bäckerhefe), Wirkstoffen (Biotin, Pantothensäure, Heteroauxin) und Vitaminen (Aneurin, Ascorbinsäure). Versuche, die Wirkungen des Lichtes durch Belüftung der Kulturen zu steigern oder zu ersetzen, schlugen fehl. Konnte doch PLUNKETT (1954, 1956) zeigen, daß *Collybia velutipes* die zunächst im Dunkeln gebildeten Hutanlagen nur dann normal ausbildet, wenn Licht gegeben und außerdem durch eine Belüftung das hemmende CO<sub>2</sub> beseitigt wurde. Auch durch Veränderung der Temperatur und der relativen Wasserdampfspannung ließ sich in den vorliegenden Unter-

<sup>1</sup> Hier und noch deutlicher in teilweise verdunkelten Parallelkulturen verhielten sich besonders die Spitzen der größeren gewiehartigen Formen positiv phototropisch. Zusammen mit dem starken Längenwachstum mag diesem insofern eine ökologische Bedeutung zukommen, als dadurch unter Umständen erst die Voraussetzungen für die Entstehung von Normalfruchtkörpern sowie für eine gute Sporenverbreitung geschaffen werden (so auch BORRIS 1934; PLUNKETT 1956). Die Normalfruchtkörper orientieren ihr Hymenium geotropisch.

<sup>2</sup> Vielleicht war WAKEFIELD'S Verdunkelung der Kolben nicht ganz lichtdicht?

suchungen bei *Schizophyllum* keine normale Entwicklung erzielen, so daß damit auch der Einwand entfällt, diese in den Starklichtkulturen sicherlich nicht konstanten Bedingungen seien für die Ergebnisse verantwortlich.

Tabelle 1. Ergebnis der Fruchtkörperkulturen der  $F_1$ -Generation des Stammes *St* in den + - Kombinationen zwischen den Geschlechtstypen  $A^3B^3 \times A^4B^4$  (links) und  $A^4B^3 \times A^3B^4$  (rechts)<sup>1</sup>

$A^3B^3$								$A^4B^3$					
$St$	1	4	8	9	11	12		$St$	2	3	10	15	
Schwachlicht													
$A^4B^4$	6	h	H	H	h	H	H	$A^3B^4$	5	H	H	H	H
	13	H	H	h	O	O	O		7	H	H	H	H <sup>N</sup>
	18	h	h	H	h	O	O		14	H	H <sup>N</sup>	H	H <sup>N</sup>
								17	h	h	H	H	
Starklicht													
$A^4B^4$	6	H <sup>N</sup>	N	N	H <sup>n</sup>	N	N	$A^3B^4$	5	N	N	N	N
	13	H <sup>N</sup>	N	H <sup>N</sup>	O	O	O		7	N	N	N	N
	18	H <sup>N</sup>	N	H <sup>N</sup>	O	O	O		14	N	N	N	N
								17	N	N	N	N	

<sup>1</sup> Sinn und Zusammenhang der in den Tabellen dargestellten Kreuzungen gehen jeweils aus dem Text hervor. Das obere Feld der Kreuzungsrechtecke stellt stets die Ergebnisse der Dunkelkulturen (bei Tab. 1 der Schwachlichtkulturen) dar, das untere die der Starklichtkulturen. Die Paarungen in Tab. 15 wurden nur im Starklicht ausgeführt.

Übereinstimmend in allen Tabellen besitzen die verwendeten Zeichen folgende Bedeutung:

- keine Schnallenbildung
- + starke Schnallenbildung
- (+) schwache Schnallenbildung
- O keine Fruchtkörperbildung
- N normale Fruchtkörperbildung
- n nicht vollentwickelte Normalfruchtkörper
- (n) steckenbleibende Normalfruchtkörperanlagen
- H Geweihfruchtkörperbildung über 1 cm groß
- h Geweihfruchtkörperbildung unter 1 cm groß
- H<sup>N</sup> Geweihfruchtkörper mit nachträglich an der Spitze entstehendem, vollentwickeltem, streuendem Normalfruchtkörper usw.

Vergleichende Versuche mit den Stämmen *St*, *Ws*, *Wi* und *Hb* sowie Kreuzungen zwischen diesen zeigten zwar einen Abfall der Fruchtkörperbildung von *St* nach *Hb* in der aufgeführten Reihenfolge bis zum völligen Ausbleiben, im übrigen über die gleiche spezifische, morphogene Wirkung des Starklichts. Die Geweihformen unterscheiden sich also von ZATTLERS Knäuelfruchtkörpern neben dem anatomischen Aufbau und der Fertilität zusätzlich durch ihre hohe Lichtabhängigkeit.



Die zweite Frage, ob man in den Geweihformen den Ausdruck einer, wenn auch nur abnormen Fruchtkörperbildung sehen darf, obwohl ihnen die Sporenbildung fehlt, wird von ZATTLER verneint, von WAKEFIELD sowie SCHOPFER u. BLUMER jedoch ohne Begründung angenommen. In der vorliegenden Arbeit werden sie von normalen Fruchtkörpern abgeleitet und künftig als „Geweihfruchtkörper“ bezeichnet und zwar aus folgenden Gründen:

1. Gut ausgebildete Geweihfruchtkörper treten nur in  $+$ -Kombinationen auf und dort mit einer Häufigkeit und Regelmäßigkeit, die dem Auftreten der Normalfruchtkörper in den entsprechenden Starklichtkulturen eigen ist (Tab. 1).

2. Wo es im Schwachlicht schon zu einer normalen Fruktifikation kommt, bildet sich diese in der Regel an den Spitzen der zunächst entstandenen Geweihfruchtkörper aus (so auch zum Teil im Starklicht). Umgekehrt konnte in einem Falle ( $Ba_1 \times St_5$ ) beobachtet werden, daß aus dem Hymenium eines großen Normalfruchtkörpers nachträglich im Schwachlicht ein Geweihfruchtkörper hervorwuchs.

3. Eine Deutung als Sklerotien oder Rhizomorphen wird dem Charakter der Geweihfruchtkörper nicht gerecht; auch kann man sie schlecht als Kulturartefakte abtun, da sie auch unter Außenbedingungen (Holz usw.) auftreten, die den natürlichen sehr nahe kommen und bei denen lichtunabhängigere Stämme normal fruktifizieren.

Demnach gehören die Geweihfruchtkörper in die Reihe der teratologischen, monströsen oder geweihartigen Dunkel- (BULLER 1905, 1906; FALCK 1909, 1923 u. a.) oder besser Schwachlichtformen. Der Auffassung, sie seien etioliierte Normalfruchtkörperstiele (BORRISS 1934 bei *Coprinus lagopus*; PLUNKETT 1953 bei *Collybia velutipes* u. a.), steht entgegen, daß *Schizophyllum* im eigentlichen Sinne keinen Fruchtkörperstiel besitzt und dessen anatomischer Aufbau (Abb. 3) ein anderer ist.

## 2. Versuche mit Kunstlicht

Es zeigte sich zunächst, daß sich die Wirkung des Sonnenlichts durch Glühlicht ersetzen ließ, dessen Spektrum ja vorwiegend im langwelligen Bereich liegt. Dies konnte nicht von vornherein erwartet werden, da nach SCHENCK (1919), BORRISS (1934) und MADELIN (1956) für die Fruchtkörperbildung die kurzwelligen Strahlen bedeutsam, die langwelligen aber unwirksam sind. Die Kunstlichtversuche lassen aber auch quantitative Aussagen über die Wirkung des Lichtes auf die Fruchtkörperbildung zu. Unschwer war zu erkennen, daß übereinstimmend beim Stamm *Ba* sowie den Paarungen  $St_{5 \times 10}$  und  $St_{14 \times 15}$  mit der Beleuchtungsstärke die Zahl der Anlagen und der ausgebildeten Fruchtkörper zunahm, ihre Größe wie auch das Luftmycel aber abnahmen (Abb. 6). Starkes Kunst- oder Sonnenlicht bedingte ein einheitliches, charakteristisches



um die Fruchtkörperbildung zu beschleunigen; das Endtrockengewicht war jedoch hier in Licht und Dunkel etwa gleich) *Coprinus lagopus* eine Unabhängigkeit beider Gegebenheiten nachwies.

Die bei mehreren Stämmen beobachteten „gestielten“, rundfächerigen Fruchtkörper (Abb. 1) gingen bei Wiederholung manchmal in die bekannte spitzfächerige Form über. Sie traten in Kultur stets an der Spitze von Geweihfruchtkörpern, im Freien aber auch für sich allein auf und sind entwicklungsphysiologisch vielleicht dadurch zu erklären, daß die Lamellen Platz genug hatten, vom Ansatzpunkt der Spreite allseits fächerförmig auszustrahlen.

Die obigen Versuche haben eindringlich gezeigt, daß das Licht der Außenfaktor ist, der bei *Schizophyllum commune* den beherrschenden Einfluß auf den Entwicklungsgang der Fruchtkörper ausübt. Das Besondere ist bei *Schizophyllum* in der hohen, zur normalen Entfaltung der Fruchtkörpergestalt und -funktion erforderlichen Beleuchtungsstärke bzw. Lichtmenge zu sehen.

Während nach LONG u. HARSCH (1918) auch einige Polyporaceen direktes Sonnenlicht verlangen, warnen andere, wie OORT (1930) für *Coprinus fimetarius* und TAKEMARU (1954) für *Collybia velutipes*, davor, die Kulturen ihm unmittelbar auszusetzen, und BADCOCK (1943) berichtet sogar von *Polyporus schweinitzii*, daß er direkte Sonnenbestrahlung auch nicht nur einige Minuten vertrage. Wahrscheinlich kommt hierin eine Beziehung zu den Lichtverhältnissen des natürlichen Standorts zum Ausdruck, so daß *Schizophyllum* in dieser Hinsicht als besonders lichtbedürftig gelten kann.

### 3. Fruchtkörperbildung im Dunkeln

Übereinstimmend berichten WAKEFIELD (1909), KNIPE (1928, 1930) sowie SCHOPFER u. BLUMER (1940), daß die Fruchtkörperbildung von *Schizophyllum* unbedingt ans Licht gebunden sei. Um so überraschender war die Feststellung, daß das Mycel des Stammes *Ba* in völliger Dunkelheit normal gestaltete und gefärbte, sporenstreuende Fruchtkörper bildete. Das Ergebnis wurde durch zweimaliges Abimpfen im Schwachlicht von der jeweils vorausgegangenen Dunkelkultur auch unter wechselnden Temperatur- und Ernährungsbedingungen bestätigt. Demnach handelt es sich offenbar nicht um eine stoffliche Nachwirkung oder Modifikation, sondern um eine erblich bedingte Erscheinung. Die völlige Unabhängigkeit vom Licht kam auch im Kunstlichtversuch in einer bei allen Beleuchtungsstärken gleich langen, sehr kurzen Entwicklungszeit (7 Tage nach der Impfung) sowie im fast gleichbleibenden Fruchtkörper-trockengewicht zum Ausdruck (graph. Darst. Abb. 5). Lediglich die allgemeinen Beziehungen hinsichtlich Zahl, Größe und Habitus der Fruchtkörper galten auch hier (Abb. 6). Insofern der physiologische Unterschied zu einem klar definierbaren Merkmalspaar führte: „Fähigkeit, im Dunkeln (und im Licht) Normalfruchtkörper oder doch deren Anlagen zu bilden“, und



„Normalfruchtkörperbildung an mehr oder weniger starkes Tages- oder Kunstlicht gebunden“, erschien eine Erbanalyse wünschenswert und aussichtsreich.

### III. Genetische Versuche und ihre Deutung

Von einem *Ba*-Fruchtkörper wurden 33 Einspormycelien gewonnen und paarweise miteinander kombiniert. Bei der Prüfung auf Schnallen stellte sich heraus, daß *Ba* im Gegensatz zu den anderen Stämmen<sup>1</sup> vom

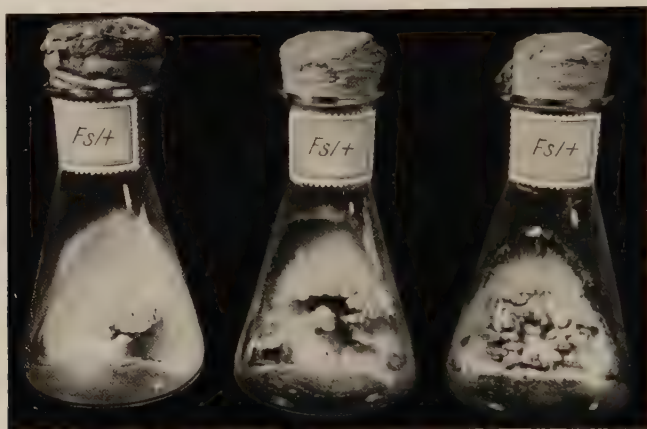


Abb. 6. Fruchtkörperbildung einer *Fs/+*-Paarung (*Ba*<sub>8x11</sub>) im — von links nach rechts — Dunkeln, Schwachlicht und Starklicht; Zahl und Größe der Fruchtkörper ändern sich im umgekehrten Verhältnis

reinen Viererschema abwich und zwar im Sinne einer verminderten Fertilität (Tab. 2). In 10 Kombinationen von 122, bei denen nach der genotypischen Beschaffenheit der Haplonten die Schnallenbildung zu erwarten war, unterblieb sie völlig; in sieben weiteren, von denen sich wie bei ersteren einige durch wenig Luftmycel ausschließlich am oberen Rande des Schrägröhrchens auszeichneten, konnten nur dort und manchmal erst bei Wiederholung vereinzelt kleine, wenig ausgeprägte Schnallen festgestellt werden.

Für eine Erklärung der Abweichungen können andere Arbeiten nicht herangezogen werden: HELDMAIER (1929/30), die bei dem gleichen Pilz auf Erweiterungen im sexuellen Verhalten prüfte, hält im Gegenteil eine alleinige Prüfung des oberen Randes der Röhrchen für unzureichend. Dagegen bezeichnet KNIEP (1918) *Schizophyllum* noch als stets schnallenbildend<sup>2</sup> und stößt erst 1920 erstmals gleich auf eine so stark verminderte Fertilität, daß das Viererschema zunächst nicht erkannt

<sup>1</sup> Dort beobachtete Abweichungen erwiesen sich entweder als Mischmycelien oder Halbmutanten mit erhöhter Fertilität oder konnten in der Regel bei Wiederholungen nicht beobachtet oder als Pseudoschnallen erkannt werden.

<sup>2</sup> Bei *Schizophyllum* hemmt danach submerses Wachstum nur die Schnallenentstehung, verlängert also die Haplophase.

werden konnte. Nach seiner Arbeitshypothese (vor allem 1929) unterliegen die Geschlechtsfaktoren gewissen Schwankungen, wobei ein gewisser minimaler Quantitätsunterschied für eine Reaktion nötig sein soll. Die folgenden Untersuchungen werden aber zeigen, daß zumindest im vorliegenden Fall die Erscheinung nicht in einer dem Minimum nahekommenden Differenz eines Allelpaares, sondern in etwas ganz anderem begründet liegt.

In den Kombinationsrechtecken der  $F_1$ -Generation hinsichtlich der Schnallenbildung (Tab.2) fällt nun bei eingehender Betrachtung auf, daß es Haplonten aller vier Mendelklassen mit stetiger und solche mit meist mehrfach<sup>1</sup> unregelmäßiger Schnallenbildung gibt, und daß alle obigen Abweichungen in Inter-se-Kreuzungen dieser letzteren auftreten.

Tabelle 2. Unregelmäßige Schnallenbildung der  $F_1$  des Stammes Ba

<i>Ba</i>		$A^1B^1$											
		1	9	12	14	18	23	27	31	33	34		
$A^2B^2$	{	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		16	+	(+)	+	+	(+)	—	+	+	+	+	
		26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		29	+	—	+	+	—	—	+	+	+	+	
<i>Ba</i>		$A^1B^2$											
		2	5	7	10	11	17	20	22	24	25	28	30
$A^2B^1$	{	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		8	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	—
		19	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
		21	+	—	—	(+)	+	+	+	+	+	(+)	(+)
		32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Dies könnte auf eine homozygote Grundlage deuten, und immerhin war ZATTLER (1924) durch solche Feststellungen sofort instande, den genetischen Zusammenhang seiner beiden Fruchtkörpertypen in einer Übersicht theoretisch verständlich zu machen. Der Ausfall der Fruchtkörperkulturen der  $F_1$ -Generation von Ba läßt dagegen weder in völliger Dunkelheit noch im Starklicht eine solche übersichtliche Beziehung erkennen (Tab.3). Die Schwachlichtkulturen, die mit ihrer Geweihfruchtkörperbildung eine Mittelstellung einnahmen, verhielten sich, von einer verständlichen Häufung der Normalfruchtkörper abgesehen, grundsätzlich wie die des Stammes St. Da sie zur Lösung der jetzt anstehenden Fragen nicht beitragen, soll auf ihre weitere Erörterung verzichtet werden. Die optimal fruktifizierenden Starklichtkulturen sind jedoch erforderlich, weil sie durch Vergleich mit den Dunkelkulturen erlauben,

<sup>1</sup> Für einmalige Abweichungen wäre die folgende Betrachtung sinnlos.

Paarungen, die nur im Dunkeln keine Fruchtkörper bilden, von denen zu unterscheiden, die überhaupt nicht fruktifizieren.

Tatsächlich trat nun die besondere physiologische Fähigkeit des *Ba*-Ausgangsmycels in der  $F_1$  wieder auf und zwar in 58 von 122 Paarungen (Tab.3). Weitere 45 Kombinationen, die im Dunkeln nicht oder nur

Tabelle 3. *Fruchtkörperbildung der  $F_1$  von Ba im Dunkeln (oben)*

<i>Ba</i>		$A^1B^1$												
		1	9	12	14	18	23	27	31	33	34			
$A^2B^2$	{	6	O	n	O	O	O	n	O	n	h	N		
		13	O	n	O	O	O	O	O	N	O	(n)		
		16	O	O	n	O	O	O	n	O	N	(n)		
		26	(n)	(n)	N	N	N	(n)	h	(n)	N	(n)		
		29	O	O	h	N	O	O	n	(n)	H <sup>N</sup>	(n)		
$A^2B^2$	{	Starklicht												
		6	N	(n)	N	N	N	n	N	n	N	N		
		13	N	N	H <sup>N</sup>	N	(n)	N	h	N	N	N		
		16	N	O	N	N	n	O	N	O	N	(n)		
		26	(n)	(n)	N	n	n	(n)	n	(n)	N	(n)		
29	N	O	n	n	O	O	n	(n)	N	(n)				
<i>Ba</i>		$A^1B^1$												
		2	5	7	10	11	17	20	22	24	25	28	30	
$A^2B^1$	{	Dunkel												
		3	n	n	(n)	N	O	O	O	O	O	O	O	h
		4	N	O	n	n	O	O	O	O	O	O	N	N
		8	n	n	O	(n)	N	N	h	N	N	N	O	O
		19	O	(n)	O	O	N	O	O	N	N	O	O	O
		21	(n)	O	O	O	N	N	n	N	N	N	O	O
$A^2B^1$	{	32	N	N	O	N	O	O	O	O	O	O	N	N
		Starklicht												
		3	n	N	(n)	N	n	H <sup>N</sup>	O	n	N	n	N	N
		4	N	n	n	n	n	N	O	n	n	N	N	N
		8	(n)	(n)	O	(n)	N	N	N	N	N	N	O	O
		19	O	(n)	(n)	(n)	N	N	n	N	N	N	O	O
$A^2B^1$	{	21	(n)	O	O	O	N	n	N	N	n	n	(n)	(n)
		32	N	N	(n)	N	N	O	H <sup>N</sup>	N	N	N	N	N

abnorm fruktifizierten, vermochten im Starklicht Fruchtkörper zu bilden. Der Rest, wie beim Stamm *St* zwischen 10—20% fruktifizierte unter beiden Lichtbedingungen gar nicht oder doch nur abnorm. Hinsichtlich des Faktors (oder der Faktoren?), der die Fruchtkörperbildung im Dunkeln bedingt, kann es sich also bei dem Ausgangsmycel nicht um eine homozygote Form handeln. Dem Bestreben, die Vererbung des



Merkmals „Dunkelfruktifikation“ auf einen monohybriden Mendelfall zurückzuführen, steht zunächst das angenäherte Zahlenverhältnis von 1:1 gegenüber. Es stützt weder die Annahme einer dominanten noch rezessiven Merkmalsausprägung, während die einer „Rückkreuzung“ sogar an unwahrscheinliche Voraussetzungen<sup>1</sup> geknüpft ist.

Abgesehen davon, daß das physiologische Merkmal die vergleichende Untersuchung des Verhaltens unter zwei verschiedenen Lichtbedingungen erfordert, tritt gegenüber den Untersuchungen ZATTLERS zusätzlich eine grundsätzliche Erschwerung auf. ZATTLER untersuchte zwei voneinander unabhängige, scharf abgegrenzte morphologische Merkmale. Hier dagegen sind die beiden untersuchten Phäne insofern abhängig voneinander, als der Ausfall des einen, nämlich der Dunkelfruktifikation, von dem anderen nicht zu unterscheiden ist und ihm bei der Auswertung zugeschlagen wird. Wird das obige Zahlenverhältnis von 58:45 unter diesem

<sup>1</sup> Geschlechtskopplung mit 50% Penetranz des dominanten Allels.

**Tabelle 4.** Nachkommenschaft der Stammkreuzung der Ba-p-Haplonten mit fünf beliebigen p-Einspormycelien des Wildstammes St; Dominanz von F<sub>s</sub>

[illegible]

Tabelle 5. *Fruchtkörper- und Schnallenbildung der F<sub>1</sub> von Ba.*

Übersichtliche Zusammenfassung der Tab. 2 und 3 durch Ordnen der Haplonten nach Fs und Fs<sup>+</sup>; *unterschiedliches Verhalten der Allelkombinationen Fs/Fs, Fs/+ und +/+*

			A <sup>1</sup> B <sup>1</sup>											
			F <sub>s</sub>				F <sub>s</sub> <sup>+</sup>							
Ba			9	23	31	34	1	12	14	18	27	33		
			Dunkel											
A <sup>2</sup> B <sup>2</sup>	{	F <sub>s</sub>	{	16	O	O	O	(n)	O	n	O	O	n	N
			26	(n)	(n)	(n)	(n)	(n)	N	N	N	h	N	
			29	O	O	(n)	(n)	O	h	N	O	n	H <sup>N</sup>	
	{	F <sub>s</sub> <sup>+</sup>	{	6	n	n	n	N	O	O	O	O	O	h
			13	n	O	N	(n)	O	O	O	O	O	O	
				Starklicht										
A <sup>2</sup> B <sup>2</sup>	{	F <sub>s</sub>	{	16	O	O	O	(n)	N	N	N	n	N	N
			26	(n)	(n)	(n)	(n)	(n)	N	n	n	n	N	
			29	O	O	(n)	(n)	N	n	n	O	n	N	
	{	F <sub>s</sub> <sup>+</sup>	{	6	(n)	n	n	N	N	N	N	N	N	
			13	N	N	N	N	N	H <sup>N</sup>	N	(n)	h	N	
A <sup>2</sup> B <sup>2</sup>	{	F <sub>s</sub>	{	16	(+)	—	+	+	+	+	+	(+)	+	+
			26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
			29	—	—	+	+	+	+	+	—	+	+	
	{	F <sub>s</sub> <sup>+</sup>	{	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
			13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

Gesichtspunkt betrachtet und dabei berücksichtigt, daß dennoch die Zahl der Dunkelfruktifikationen überwiegt, so erscheint die Annahme folgender Arbeitshypothese gerechtfertigt: das Merkmal Dunkelfruktifikation wird dominant ausgeprägt. Der zugrunde liegende Erbfaktor, er soll Fs genannt werden<sup>1</sup>, besitzt herabgesetzte Penetranz. Dem Ausgangsstamm *Ba* käme danach die Erbformel A<sup>1</sup>/A<sup>2</sup>; B<sup>1</sup>/B<sup>2</sup>; Fs/+ zu.

Daß die Dominanz sozusagen maskiert ist, bedingt ein besonderes, auch von ZATTLERS Methode abweichendes Vorgehen. Zunächst wurden alle *Ba*-Einspormycelien der p-Generation mit fünf beliebigen p-Haplonten aller Geschlechtstypen der Wildrasse *St* gekreuzt. Durch eine derartige Stammkreuzung, die einer Mendelschen Rückkreuzung entspricht und dank der multiplen Allelie der Geschlechtsfaktoren leichter als eine Rückkreuzung innerhalb des Stammes *Ba* durchzuführen ist, wurde ein eindeutiges Ergebnis gewonnen (Tab. 4). Das Merkmal Dunkelfruktifikation wird gegenüber dem Wildstamm, der dafür keine Anlage besitzt, dominant verwirklicht.

<sup>1</sup> F = dominant Fruchtkörperbildung im Dunkeln, s = rezessiv sterilitätsbedingend (zur Begründung siehe S. 417f.); + oder Fs<sup>+</sup> = das zugeordnete Wildallel (keine Fruchtkörperbildung im Dunkeln und keine Sterilitätswirkung).

Tabelle 5 (Fortsetzung)

		A <sup>1</sup> B <sup>2</sup>												
		Fs						Fs <sup>+</sup>						
		Ba	2	5	7	10	28	30	11	17	20	22	24	25
A <sup>2</sup> B <sup>1</sup>	Fs	8	n	n	O	(n)	O	O	N	N	h	N	N	N
		19	O	(n)	O	O	O	O	N	O	O	N	N	O
		21	(n)	O	O	O	O	O	N	N	n	N	N	N
	Fs <sup>+</sup>	3	n	n	(n)	N	O	h	O	O	O	O	O	O
		4	N	O	n	n	N	N	O	O	O	O	O	O
		32	N	N	O	N	N	N	O	O	O	O	O	O
A <sup>2</sup> B <sup>1</sup>	Fs	8	(n)	(n)	O	(n)	O	O	N	N	N	N	N	N
		19	O	(n)	(n)	(n)	O	O	N	N	n	N	N	N
		21	(n)	O	O	O	(n)	(n)	N	n	N	N	n	n
	Fs <sup>+</sup>	3	n	N	(n)	N	N	N	n	H <sup>N</sup>	O	n	N	n
		4	N	n	n	n	N	N	n	N	O	n	n	N
		32	N	N	(n)	N	N	N	N	O	H <sup>N</sup>	N	N	N
A <sup>2</sup> B <sup>1</sup>	Fs	8	(+)	+	+	+	(+)	—	+	+	+	+	+	+
		19	—	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+
		21	+	—	—	(+)	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+
	Fs <sup>+</sup>	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Daß die Dominanz sich in 16 von 33 *Ba*-Haplonten ausprägt (Erwartung 50%), ist eine Stütze für die Annahme eines Faktorenpaares Fs/+ im heterozygoten Ausgangsfruchtkörper. Auf Grund dieser „Rückkreuzung“ ist es möglich, unter den p-Einspormycelien von *Ba* eindeutig die Fs-Haplonten von den Fs<sup>+</sup>-Haplonten zu unterscheiden und die Ergebnisse der Tab.3 dadurch gut durchschaubar darzustellen, daß innerhalb jedes Geschlechtstyps die Haplonten mit dem gleichen Allel zusammengefaßt werden<sup>1</sup> (Tab.5). Im Bereich der homozygoten +/+ Kombinationen herrscht strenge Abhängigkeit der Fruchtkörperbildung vom Licht. Sämtliche Dunkelfruktifikationen beschränken sich auf das Gebiet der heterozygoten Fs/+ und homozygoten Fs/Fs-Paarungen. Die Wirkung des Lichts besteht hier lediglich in einer quantitativen Förderung. Soweit vermag die Annahme eines Mendelfaktors alle Befunde zu erklären. Beim Vergleich der Fs/+ Kreuzungen mit den reinerbig dominanten sticht nun aber hervor, daß die Ausbildung wohlentwickelter,

<sup>1</sup> In derselben Weise könnten jetzt auch die Ergebnisse der Tab.4 übersichtlicher dargestellt werden.



streuender Fruchtkörper den beiden  $Fs/+$ -Quadranten vorbehalten ist, während die  $Fs/Fs$ -Paarungen nur in zwei Fällen über das Stadium der Fruchtkörperanlagen hinauskommen und in über 50% überhaupt nicht fruktifizieren. Ist bei ersteren Licht zwar entbehrlich aber noch fördernd, so wird bei letzteren das Maximum der Lichtunabhängigkeit erreicht.

Auf diesen Sonderfall „unvollständiger Dominanz“ in der Mutationsrasse (im Sinne KÜHNS) wirft nun ein Vergleich der Fruchtkörperbildung mit der der Schnallen einiges Licht. Es zeigt sich nämlich, daß, von zwei

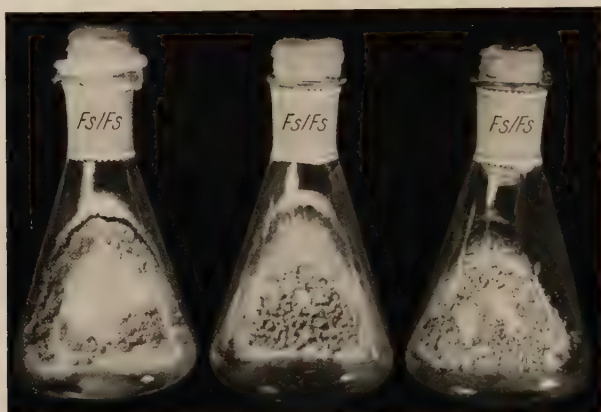


Abb. 7. Fruchtkörperanlagen einer  $Fs/Fs$ -Paarung ( $Ba_{24} \times 31$ ) im — von links nach rechts — Dunkeln, Schwachlicht und Starklicht; Sterilitätswirkung

Ausnahmen abgesehen, die Kombinationen mit ausgebliebener oder wenig ausgeprägter Schnallenbildung alle  $Fs/Fs$ -Paarungen sind. Offenbar handelt es sich um die Wirkung eines Sterilitätsfaktors, der ja nach der Definition von HADORN (1955) die Entstehung funktionstüchtiger Keimzellen verhindert oder die Morphologie bzw. die Physiologie eines Organismus derart ändert, daß ein erfolgreicher Ablauf der Sexualvorgänge unmöglich wird. Ein begrifflich so gefaßter Sterilitätsfaktor erklärt nicht nur das Ausbleiben der Schnallenbildung oder schon der Plasmogamie, sondern schließt auch die Deutung für das Auftreten der in der Entwicklung steckenbleibenden Fruchtkörperanlagen in sich ein, die ja dank der Trennung von Plasmogamie und Karyogamie bei den Basidiomyeeten in die zeitlich und räumlich stark gedehnten Sexualvorgänge fallen<sup>1</sup>.

Der Faktor  $Fs$  übt nun einen mehr oder weniger starken Einfluß auf alle mit der Fruchtkörperbildung im Zusammenhang stehenden Ent-

<sup>1</sup> Das abweichende Verhalten der beiden Paarungen  $Ba_{16} \times 13$  und  $Ba_{13} \times 29$  wird ebenfalls erklärlich, wenn man zusätzlich berücksichtigt, daß als einzige Stammkreuzung  $Ba_{18} \times St_4$  keine Schnallen bildete. Sicher ist eine individuelle, physiologische Besonderheit des Haplonten  $Ba_{18}$  dafür verantwortlich.

wicklungsvorgänge aus. So fielen  $Fs/+$ -Paarungen in Kreuzungen innerhalb von *Ba* und vor allem zwischen verschiedenen Stämmen häufig durch zahlreiche, große, braungelb gefärbte und kaum „behaarte“ Fruchtkörper auf, deren Bildung häufig schon einsetzte, bevor das Mycel den halben Durchmesser durchwachsen hatte. Die Entwicklungsgeschwindigkeit, Zahl und Größe der  $+/+$ -Fruchtkörper fielen dagegen ab; sie streuten auch nicht so reichlich und sahen ihrer stärkeren „Behaarung“ wegen weißgelb aus. Glichen sie innerhalb von *Ba* grundsätzlich den Fruchtkörpern der Inter-se-Kreuzung von *St*, so verwischten sich in Stammkreuzungen die Unterschiede zu den Heterozygoten fast völlig (Abb.8). Ein besonders charakteristischer Habitus wurde durch den Genotyp  $Fs/Fs$  bedingt (Abb.7). Teils bildeten sich hier zahlreiche, nie mehr als 1—3 mm große, gelbbraune, schwach „behaarte“ Fruchtkörperanlagen, die zunächst kugelig, später gestreckt mit einer Einsenkung an der Spitze in dieser Weise auch die Entwicklung von  $Fs/+$ -Fruchtkörpern einleiten. In anderen reinerbigen Kombinationen verschmolzen sie jedoch zu einer geschlossenen, pseudoparenchymatischen Mycelmasse, die am Sockel stets dicht „behaart“, auf ihrer hirntartigen Oberfläche dagegen durch reihenweise angeordnete Hyphenbüschel dem bloßen Auge so etwas wie Lamellenanlagen vortäuschten. Diese Gebilde manifestierten sich unabhängig von der Beleuchtung sehr regelmäßig (Abb.7) und waren in jedem Falle steril. Die Mutationsrasse kann also nicht weitergezüchtet werden.

Um die Annahme eines dominanten Mendelfaktors zu erhärten, soll durch Kreuzungsversuche geprüft werden, ob sich die Nachkommenschaft der  $+/+$ -Fruchtkörper rein weiterzüchten läßt und aus der Folgegeneration der  $Fs/+$ -Paarungen wieder beide Merkmale in dem vom Ausgangsstamm *Ba* her bekannten Verhältnis herauspalten.

Von einem Fruchtkörper der im Dunkeln gut fruktifizierenden  $Fs/+$ -Paarung  $Ba_{2 \times 4}$  ( $= 2Ba$ ) wurden 20 Einspormycelien,  $2Ba_{1-20}$ , gewonnen. Um sie hinsichtlich ihres Faktors für Dunkelfruktifikation eindeutig zu bestimmen, wurden sie ebenfalls mit den fünf *St*-Testmycelien gekreuzt (Tab.6 links).  $Fs$  manifestiert sich in den Paarungen von 11 der 20  $2Ba$ -Haplonten und zeigt wieder eine auffallend hohe Penetranz und Expressivität. Auch die reinerbig rezessiven Kombinationen fruktifizieren im Licht wieder außerordentlich stark und regelmäßig. Die Selbstung der  $2Ba$ -Einspormycelien kann hiernach wieder in einem übersichtlichen Kreuzungsschema dargestellt werden (Tab.7), in dem neben der unterschiedlichen Lichtabhängigkeit vor allem abermals die verschieden starke Expressivität des Faktors  $Fs$  in den Allelkombinationen  $Fs/+$  und  $Fs/Fs$  sowie die in letzteren gestörte Schnallenbildung zutage treten. Die  $Fs/+$ -Paarung  $2Ba$  verhält sich also tatsächlich wie der als heterozygot angenommene Ausgangsstamm *Ba*. Demgegenüber erwiesen sich





die von der im Dunkeln nicht fruktifizierenden  $+/+$ -Kombination  $Ba_{1 \times 6}$  ( $= 1Ba$ ) abgeleiteten Einspormycelien der  $f_1$ -Generation  $1Ba_{1-7}$  in der Stammkreuzung durchweg als  $Fs^+$ -Haplonten (Tab. 6 Mitte). Nach Inter-se-Kreuzung wurde eine  $F_2$ -Generation erhalten (Tab. 8), die ebenso

Tabelle 7. *Ba-F<sub>2</sub>-Fruchtkörper- und Schnallenbildung.*  
*F<sub>1</sub> der Fs/+ - Paarung 2 Ba*

		A <sup>1</sup> B <sup>1</sup>								A <sup>1</sup> B <sup>2</sup>									
		Fs			Fs <sup>+</sup>					Fs				Fs <sup>+</sup>					
2Ba		9	10	16	1	4	17	2Ba		5	8	18	2	7	13	14			
		Dunkel						12		Dunkel									
A <sup>2</sup> B <sup>2</sup>	Fs	6	O (n)	O	N	N	O	A <sup>2</sup> B <sup>1</sup> Fs <sup>+</sup>	12	(n)	O	n	O	O	O	O			
		11	O	O	O	O	N			n	Starklicht								
		15	O	O	O	n	N			n	A <sup>2</sup> B <sup>1</sup> Fs <sup>+</sup>	12	n	(n)	N	n	H <sup>n</sup>	N	n
		19	O	O	O	O	N			(n)			A <sup>2</sup> B <sup>1</sup> Fs <sup>+</sup>	12	+	+	+	+	+
	20	(n)	(n)	O	N	N	N												
		Fs <sup>+</sup>	3	N	N	N	O	O	O										
		Starklicht																	
A <sup>2</sup> B <sup>2</sup>	Fs	6	O (n)	O	N	N	O	A <sup>2</sup> B <sup>1</sup> Fs <sup>+</sup>	12										
		11	O	O	O	n	N			n									
		15	O	O	O	n	N			n									
		19	O	O	O	O	N			(n)									
	20	(n)	(n)	O	N	N	N												
		Fs <sup>+</sup>	3	N	N	N	N	N	H <sup>N</sup>										
A <sup>2</sup> B <sup>2</sup>	Fs	6	+	+	(+)	+	+	+	A <sup>2</sup> B <sup>1</sup> Fs <sup>+</sup>	12									
		11	+	(+)	+	+	+	+											
		15	—	(+)	+	+	+	+											
		19	+	+	+	+	+	+											
	20	+	+	—	+	+	+												
		Fs <sup>+</sup>	3	+	+	+	+	+	+										

wie die aus 1Ba<sub>4×14</sub> (= 4Ba) gezogene F<sub>3</sub> (Tab. 11) keine Dunkelfruktifikationen aufwies. Paarungen, denen der rezessive Faktor homozygot zugeschrieben werden muß, verhalten sich also in ihrer Nachkommenschaft wie die Wildrasse erblich konstant. Hiermit im Einklang stehen auch die Ergebnisse der Rückkreuzungen der beiden p-Elternhaplonten von 1Ba, nämlich Ba<sub>1</sub> (A<sup>1</sup>B<sup>1</sup>+) und Ba<sub>2</sub> (A<sup>2</sup>B<sup>2</sup>+) mit den jeweils hin-

ihnen kreuzbaren  $1Ba$ - $Fs^+$ -Einspormycelien der  $f_1$  (Tab. 8). Fruchtkörperbildung tritt nur im Licht auf, während die Rückkreuzung von  $1Ba_4$  ( $A^1B^2+$ ) und  $1Ba_{14}$  ( $A^2B^1+$ ), den Elternhaplonten von  $4Ba$ , mit allen jeweils verträglichen  $Fs$ - und  $Fs^+$ -p-Haplonten des Ausgangsfruchtkörpers  $Ba$  erwartungsgemäß in den  $Fs/+$ -Paarungen wieder Dunkelfruktifikationen lieferte (Tab. 9, 10).

In der Tatsache, daß die Starklichtkulturen von  $1Ba$  in der  $F_2$  durchschnittlich, die von  $4Ba$  in der  $F_3$  jedoch sehr stark und regelmäßig Fruchtkörper bilden, darf vielleicht die Möglichkeit gesehen werden, auf die ZATTLER (1924) anspielt, nämlich durch bewußte Auswahl üppig

fruktifizierender Paarungen zur Weiterzucht, einen erblich gut fruktifizierenden Stamm zu züchten.

Wurde vom  $F_s/+$ -Ausgangsstamm  $Ba$  eine noch in der  $F_3$  ( $4Ba \times 4Ba$ ) rein rezessive Rasse aus dem  $+/+$ -Fruchtkörper der  $F_1$ ,  $1Ba$ , gewonnen, so konnte auch aus der  $F_s/+$ -Paarung der  $F_1$ , nämlich  $2Ba$ , durch

Tabelle 8.  $Ba$ - $F_2$ -Fruchtkörperbildung

$F_1$  der  $F_s^+/F_s^+$ -Paarung  $1Ba$ . Rückkreuzung der  $1Ba$ - $F_s^+$ -Einspormycelien mit den  $F_s^+$ -Elternhaplonten von  $1Ba$ ,  $Ba_1$  und  $Ba_6$

		$A^1B^1F_s^+$								$A^2B^2F_s^+$							
		$1Ba$								$1Ba$							
		3	10	12	17	18	$Ba_1$			1	5	8	9	11	14	16	
		Dunkel								Dunkel							
$A^2B^2F_s^+$	6	O	H	h	O	O	O	$A^1B^2F_s^+$	2	O	O	O	O	O	O	O	
	7	O	O	O	O	O	O		4	O	O	O	O	O	O	O	
	13	O	O	O	O	O	O		15	O	O	O	O	O	O	O	
	$Ba_6$	O	O	O	O	O	O										
		Starklicht								Starklicht							
$A^2B^2F_s^+$	6	H	H <sup>n</sup>	H <sup>n</sup>	N	H <sup>N</sup>	O	$A^1B^2F_s^+$	2	N	N	N	N	N	N	n	
	7	N	N	N	N	H <sup>N</sup>	N		4	n	N	N	n	N	N	N	
	13	N	n	n	H <sup>N</sup>	H <sup>n</sup>	N		15	N	O	H <sup>n</sup>	O	H	N	H <sub>n</sub>	
	$Ba_6$	N	N	N	N	N	N										

Tabellen 9 und 10. Rückkreuzung der  $F_s^+ \cdot f_1$ -Geschwisterhaplonten  $1Ba_4$  und  $1Ba_{14}$  mit den jeweils verträglichen  $F_s$ - und  $F_s^+$ - $p$ -Einspormycelien von  $Ba$

		$A^2B^1$					
		$F_s$			$F_s^+$		
$Ba$		8	19	21	3	4	32
		Dunkel					
$A^1B^2 F_s^+$	$1 Ba_4$	N	N	(n)	O	O	O
		Starklicht					
$A^1B^2 F_s^+$	$1 Ba_4$	N	N	n	N	N	N

		$A^1B^2$									
		$F_s$					$F_s^+$				
$Ba$		2	5	7	10	28	30	11	17	20	22
		Dunkel									
$A^2B^1 F_s^+$	$1 Ba_{14}$	N	O	N	N	N	N	O	O	O	O
		Starklicht									
$A^2B^1 F_s^+$	$1 Ba_{14}$	N	N	N	N	N	N	N (n)	N	N	N

Kreuzung der  $Fs^+ \cdot f_1$ -Haplonten  $2Ba_{3 \times 4}$  ( $= 5Ba$ ) und daraus eine der Wildrasse entsprechende  $F_3$ -Nachkommenschaft gezogen werden (Tab. 12). Überhaupt entsprachen in verschiedenen Generationen von  $Ba$  alle  $+ / +-$ -Paarungen in ihrem Verhalten den Wildstämmen, so daß diesen der gleiche rezessive Faktor  $Fs^+$  (oder jeweils ein multiples Allel  $Fs^n$ ) zugeschrieben werden kann.

Tabelle 11.  $Ba \cdot F_3$ -Fruchtkörperbildung.  
 $F_1$  der  $Fs^+ / Fs^+$ -Paarung 1  $Ba_{4 \times 14} = 4 Ba$

4 Ba		$A^2B^2Fs^+$				
		5	6	13	14	15
Dunkel						
$A^1B^1Fs^+$	7	O	h	O	O	O
	9	O	O	O	O	O
	11	O	O	O	O	O
	12	O	O	O	O	O
Starklicht						
$A^1B^1Fs^+$	7	N	N	n	N	N
	9	N	N	N	N	N
	11	N	N	N	N	N
	12	N	N	N	N	N

4 Ba		$A^2B^1Fs^+$				
		1	2	3	4	8
Dunkel						
$A^1B^2Fs^+$	10	O	O	O	O	O
Starklicht						
$A^1B^2Fs^+$	10	N	N	N	N	N

Tabelle 12.  $Ba \cdot F_3$ -Fruchtkörperbildung.  
 $F_1$  der  $Fs^+ / Fs^+$ -Paarung 2  $Ba_{3 \times 4} = 5 Ba$

5 Ba		$A^2B^1Fs^+$					
		5	6	7	8	11	12 15
Dunkel							
$A^1B^2Fs^+$	1	O	O	O	O	O	O
Starklicht							
$A^1B^2Fs^+$	1	H <sup>N</sup>	H <sup>n</sup>	H <sup>N</sup>	H <sup>N</sup>	n	N n

5 Ba		$A^1B^1Fs^+$			
		2	4	10	13
Dunkel					
$A^2B^2Fs^+$	3	O	O	O	O
	9	O	O	O	O
	14	O	O	O	O
Starklicht					
$A^2B^2Fs^+$	3	N	H <sup>N</sup>	H <sup>n</sup>	n
	9	N	H <sup>N</sup>	H <sup>N</sup>	n
	14	N	H <sup>n</sup>	N	n

Auch ein aus einer  $+ / +-$ -Stammkreuzung  $Ba_6 \times St_5$  gewonnener Fruchtkörper ( $= 1BaSt$ ) zeigte nach Selbstung erwartungsgemäß keine Dunkelfruktifikationen (Tab. 14). Diese traten dagegen in der  $F_1$  der im Dunkeln schnell und üppig fruktifizierenden Paarung  $Ba_{28} (A^1B^2Fs) \times St_5 (A^3B^4+) = 2BaSt$  wieder auf (Tab. 13). Da von den vier auftretenden Geschlechtstypen  $A^1B^2$ ,  $A^1B^4$ ,  $A^3B^4$  und  $A^3B^2$  nur ersterer sich mit allen fünf  $Fs^+$ -Testhaplonten von  $St$  rückkreuzen läßt, wurden auf diese Weise nur



die Einspormycelien dieser Geschlechtsfaktorenkombination hinsichtlich ihrer Anlage für Dunkelfruktifikation bestimmt (Tab. 6 rechts). Die Kreuzungsübersicht (Tab. 13) erlaubt aber nach den bisherigen Ergebnissen, auch die Haplonten der anderen Mendelklassen anzusprechen. So muß  $2BaSt_3$ , da es mit dem als Fs erkannten  $2BaSt_9$  einen Normalfruchtkörper im Dunkeln bildet, ein  $Fs^+$ -Haplont sein. Daraus, daß  $2BaSt_{2 \times 11}$

Tabelle 13.

Fruchtkörperbildung der  $F_1$  aus der  $Fs^+/+$ -Stammkreuzung  $Ba_{28} \times St_5 = 2 BaSt$

2 BaSt	A <sup>1</sup> B <sup>2</sup>							
	Fs	+	Fs	Fs	+	Fs	Fs	
	1	4	5	9	11	12	14	
Dunkel								
A <sup>3</sup> B <sup>4</sup>	Fs 2	(n)	O	O	(n)	n	O	(n)
	+ 3	h	O	n	N	O	O	O
	Fs 15	O	O	(n)	(n)	O	O	(n)
Starklicht								
A <sup>3</sup> B <sup>4</sup>	Fs 2	(n)	N	O	(n)	N	(n)	(n)
	+ 3	N	N	N	N	N	N	N
	Fs 15	n	H	(n)	(n)	N	(n)	(n)

2 BaSt	A <sup>1</sup> B <sup>4</sup>			
	Fs	+	Fs	?
	6	7	8	13
Dunkel				
A <sup>3</sup> B <sup>2</sup> Fs 10	(n)	N	(n)	O
Starklicht				
A <sup>3</sup> B <sup>2</sup> Fs 10	(n)	N	(n)	(n)

Tabelle 14. Fruchtkörperbildung der  $F_1$  aus der  $Fs^+/Fs^+$ -Stammkreuzung  $Ba_6 \times St_5 = 1 BaSt$ 

		A <sup>3</sup> B <sup>4</sup> +					A <sup>2</sup> B <sup>4</sup> +							
1 BaSt		3	8	15	1 BaSt		2	5	7	11	12	14		
		Dunkel					Dunkel							
A <sup>2</sup> B <sup>2</sup> +	$\left\{ \begin{array}{l} 6 \\ 9 \end{array} \right.$	O	O	O	A <sup>3</sup> B <sup>2</sup> +	$\left\{ \begin{array}{l} 1 \\ 4 \\ 10 \\ 13 \end{array} \right.$	O	O	O	h	O	h		
		O	O	O			O	O	O	O				
Starklicht			Starklicht											
A <sup>2</sup> B <sup>2</sup> +	$\left\{ \begin{array}{l} 6 \\ 9 \end{array} \right.$	N	O	N			A <sup>3</sup> B <sup>2</sup> +	$\left\{ \begin{array}{l} 1 \\ 4 \\ 10 \\ 13 \end{array} \right.$	h	N	N	n	n	n
		N	H	N					N	N	n	N	N	N
			(n)											

Dunkelfruktifikation zeigt, wobei  $2BaSt_{11}$  als  $Fs^+$  bestimmt ist, folgt für  $2BaSt_2$  der Faktor Fs, für den auch die Fruchtkörperanlagen mit den Fs-Einspormycelien  $2BaSt_{1,9,14}$  sprechen. Auf diese Weise lassen sich auch die übrigen festlegen, mit Ausnahme von  $2BaSt_{13}$ , bei dem weitere Kreuzungen erforderlich wären. Das Auftreten der für den Genotyp  $Fs/Fs$  kennzeichnenden Fruchtkörperanlagen nach dem Einkreuzen des Faktors Fs in einen Stamm, der diese Anlage nicht besitzt, zeigt besonders

deutlich, daß es sich bei Fs um eine bestimmte, selbständige, in den Chromosomen lokalisierte Erbinheit handelt.

Die umfangreichen<sup>1</sup>, experimentellen Befunde fügen sich also reibungslos der anfänglichen Arbeitshypothese, daß die besondere physiologische Leistung des *Schizophyllum*-Stammes *Ba*, im Dunkeln Fruchtkörper zu bilden, durch einen dominanten Mendelfaktor bedingt wird. Das Gen<sup>2</sup> Fs ist nicht mit einem Allel des Geschlechtsfaktors A oder B gekoppelt. Dies folgt daraus, daß es mit annähernd gleicher Häufigkeit (Erwartung 25%) mit den vier Kombinationen der Geschlechtsfaktoren vorkommt (Tab. 4, 5, 6, 7). In der F<sub>1</sub> der Stammkreuzung *2BaSt* mendelt Fs auch unabhängig mit den neuen multiplen Allelen (Tab. 13).

Auffallend ist, daß sich Fs in heterozygoten Stammkreuzungen mit *St* schnell und mit erhöhter Penetranz und Expressivität ausprägt und auch die *BaSt*-+/+-Paarungen im Licht mit großer Regelmäßigkeit üppige Fruchtkörper bilden (Tab. 4, 6; Abb. 8). Ein entsprechendes Verhalten zeigte sogar der nach Selbstung auch im Starklicht nur sehr schwach und langsam fruktifizierende Stamm *Wi* nach Einkreuzen von *Ba*-Haplonten (Tab. 15, 16). Diese starke Steigerung der Fruchtkörperbildung in den F<sub>1</sub>-Bastarden kann vielleicht durch Heterose erklärt werden.

Bei Annahme mehrerer, additiv zusammenwirkender, dominanter Gene käme diesen nicht nur ein verschiedener Wirkungsgrad sondern auch ein jeweils spezifischer Einfluß auf Entwicklungsgeschwindigkeit sowie Zahl und Größe der Fruchtkörper zu: daher wäre auch Fs zu ihnen zu rechnen (siehe S. 406 f). Bei *BaSt* und *BaWi* könnten Zahl und Häufigkeit der Hauptgene sowie durch die verschiedenen Restgenotypen deren Penetranz und Expressivität schwanken.

Das Vorliegen eines Luxurierens der F<sub>1</sub>-Bastarde erfordert neben der über beide Elternteile hinausgehenden Merkmalssteigerung zusätzlich (KAPPERT 1930) den in den Folgegenerationen fortschreitenden Abfall der Ausprägungsstärke und -häufigkeit bei Inter-se-Kreuzung. Obgleich jeweils von den üppigsten Fruktifikationen ausgegangen wurde, konnte tatsächlich auch letzteres in der F<sub>2</sub>-Nachkommenschaft der Bastardfruchtkörper *2BaSt* und *1BaSt* beobachtet werden (Tab. 13, 14). Da sicher mehrere Faktoren mitspielen, können schon in der F<sub>2</sub> verhältnismäßig wenig Individuen mit günstiger Faktorenkombination auftreten; im Fall des Fs/+-Fruchtkörpers *2BaSt* wird allerdings dies Nachlassen der Fruchtkörperbildung durch den Sterilitätseffekt der Fs/Fs-Paarungen übertrieben.

Stammkreuzungen sind also am geeignetsten, um bei schlecht fruktifizierenden Stämmen zu guter Fruchtkörperbildung zu kommen.

<sup>1</sup> Allein die Zahl der Fruchtkörperkulturen in den Erlenmeyerkolben belief sich schon bei einmaliger Ausführung auf 2000 Stück; die dazu erforderlichen Schrägröhrchen überstiegen diese Anzahl.

<sup>2</sup> Die Möglichkeit einer Chromosomenmutation irgendeiner Art, die ja auch mendelt, muß vernachlässigt werden.

Wenn  $St_3$  in der Reihe der Prüfmycelien (Tab. 4, 6) fehlt, so liegt das daran, daß es mit der Zeit fortschreitend die Fähigkeit zur Fruchtkörper- und schließlich auch zur Schnallenbildung verlor. Mit dieser Besonderheit einiger *St*-Einspormycelien ging ein bezeichnender Habitus einher: das Luftmycel schwand völlig, und an seine Stelle traten nasse, fädige, dem Substrat anliegende Hyphen. Eine Regeneration durch einen Wechsel des Nährbodens war ebenso unmöglich wie der Nachweis einer Infektion.

Tabelle 15. Schwache Fruchtkörperbildung der  $F_1$  des Wildstammes *Wi* im Starklicht

	<i>Wi</i>	$A^5B^4+$							<i>Wi</i>	$A^5B^4+$			
		3	7	9	11	14	18			2	5	8	13
$A^5B^5 +$	1	O	O	O	O	O	O	$A^5B^5 +$	6	O	O	O	O
	4	O	O	(n)	O	N	O		10	O	O	O	O
	12	O	(n)	(n)	(n)	O	N		16	h	O	O	O
	15	O	O	O	O	O	n		17	O	h	h	(n)

Tabelle 16. Fruchtkörperbildung der Stammkreuzung zwischen *Ba*- und *Wi*-*p*-Haplonten; Einfluß des Einkreuzens von *Ba*-Einspormycelien

		$A^1B^2Fs$						$Fs^+$			
		$A^1B^1$			$A^2B^1$			$A^1B^1$		$A^2B^1$	
		2	5	7	1	3	4	6			
<i>Ba</i>											
<i>Wi</i>											
		Dunkel									
$Fs^+$	$A^5B^5$ 1	N	N	N	O	O	O	h			
	$A^5B^6$ 2	N	n	N	O	O	h	O			
	$A^6B^6$ 3	N	(n)	N	O	h	O	O			
	$A^5B^5$ 4	O	O	N	O	O	O	O			
	$A^5B^6$ 5	O	O	N	O	O	O	O			
		Starklicht									
$Fs^+$	$A^5B^5$ 1	N	N	N	O	n	(n)	N			
	$A^5B^6$ 2	N	N	N	N	n	N	N			
	$A^6B^6$ 3	N	N	N	N	N	N	N			
	$A^5B^5$ 4	(n)	O	N	O	O	O	N			
	$A^5B^6$ 5	O	O	N	O	O	O	n			

Beim Zusammenimpfen zweier verträglicher  $Fs^+$ - oder eines  $Fs^+$ - und eines  $Fs$ -Haplonten mit einem damit unverträglichen  $Fs$ -Einspor- oder  $Fs/Fs$ -Paarkernmycel ergaben sich keine Anhaltspunkte für eine stoffliche Beeinflussung hinsichtlich der Fähigkeit, im Dunkeln zu fruktifizieren oder nur Fruchtkörperanlagen bilden zu können.

Vielsporkulturen von den Ausgangsstämmen, den Ausgangsfruchtkörpern der einzelnen Generationen und einer Anzahl beliebiger  $Fs/+$ - und  $+/+-$ -Fruchtkörper zeigten, wenn auch weniger ausgeprägt als die Zweierkombinationen, grundsätzlich die Lichtabhängigkeit der Fruchtkörperbildung, die nach der genetischen Konstitution zu erwarten war.

Nun steht es bei den Ausgangsstämmen nur für je zwei miteinander verträgliche Geschlechtstypen frei, ihnen von beiden Reihen multipler

Alle beliebige der in Aussicht genommenen Exponenten zuzuschreiben; die Benennung der beiden übrigen kann dann entweder auf Grund der von KNIEP (1928, 1929) entdeckten höheren Mutationsrate im A-Locus oder, wie hier, nach PAPAŽIAN (1949, 1950b, 1951) mit Hilfe des in den vier grundsätzlichen Kombinationstypen bezeichnenden Habitus erfolgen. Das Ergebnis der Versuche in Malzagar-Petrischalen zeigte übereinstimmend für alle Stämme, daß die Unterschiede nicht so scharf



Abb. 8. Steigerung der Fruchtkörperbildung in +/+ -Stammkreuzungen ( $Ba_{33} \times St_{1,2,4,5,6,7}$ ); Fläche des größten Fruchtkörpers  $Ba_{33} \times St_5 = 6,6 \text{ cm}^2$ .  $St_7$  bewirkt eine besondere Gestalt!

hervortraten, wie sie PAPAŽIAN (1950b) abbildet. Vor allem in den Kombinationen mit übereinstimmendem B-Allel bildete sich die „Barage“ nur vorübergehend und schwach aus; aber auch die „Flat“-Mycelien der Haplonten mit gemeinsamem A-Faktor ließen manchmal Luftmycel erkennen. RAPER u. SAN ANTONIO (1954) weisen angesichts ähnlicher Beobachtungen auf einen individuellen Einfluß der Einspormycelien und auf die unterschiedlichen Kulturbedingungen hin. Danach verwischen sich die Charakteristica auf Nährböden, die reich an natürlichen Substanzen sind (Malzextrakt)<sup>1</sup>.

Immerhin erwiesen sich Geschlechtsmutationen, die an zwei letztlich auf diese Weise bestimmten 1Ba-Haplonten auftraten, als Mutationen im A-Locus<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> PAPAŽIAN verwendet einen Glucose-Pepton-Nährboden.

<sup>2</sup> PAPAŽIANs Faktoren entsprechen wahrscheinlich denen KNIEPS (PAPAŽIAN 1951).



#### IV. Schlußbetrachtungen

Die tiefgreifende Wirkung des Lichtes auf die Entwicklung der Fruchtkörper äußert sich in dreifacher Weise: 1. auslösend und fördernd<sup>1</sup>, 2. formativ und 3. tropistisch<sup>2</sup>. Daß das Licht nicht nur als auslösender Reiz des verwickelten Prozesses der Fruchtkörperbildung in Betracht kommt, geht schon aus dem Fehlen einer Nachwirkung wie auch aus der Steigerung des Fruchtkörpertrockengewichts hervor. Die fördernde Wirkung gilt sicher nur bis zu einem bestimmten Lichtoptimum (Abb. 5); ob die Anlage der Fruchtkörper durch eine vorhergehende Hemmung des vegetativen Mycelwachstums, wie FALCK (1923) meint, ausgelöst wird, kann auch hier nicht entschieden werden. Da nichts über ein die Suszeption der Lichtenergie vermittelndes Pigment bekannt ist und auch noch nicht versucht wurde, gewisse Stufen der zur Fruchtkörperbildung führenden Stoffwechselvorgänge experimentell zu trennen, fehlt hinsichtlich der morphogenen Wirkung des Lichtes jede Vorstellung.

Wenn auch von zwei in positiver wie in negativer Hinsicht wirtschaftlich bedeutsamen Hymenomyceten, *Psalliota bispora* (WOLF u. WOLF 1949; HAWKER 1950) und *Merulius lacrymans* (FALCK 1923), bekannt ist, daß ihre Fruchtkörperbildung unabhängig vom Licht ist, so müssen Dunkelfruktifikationen doch als Ausnahmen gelten. Unter einigen Dutzend untersuchter Hymenomycetenarten besitzen nach LONG u. HARSCH (1918) nur drei, sämtlich Polyporaceen, diese besondere physiologische Fähigkeit. Schon BREFELD (1889) unterscheidet neben solchen Arten, die eine bestimmte Lichtmenge zur Induktion der Fruchtkörperbildung erfordern, eine weitere morphologische Gruppe, deren Vertreter im Dunkeln zwar Fruchtkörper anlegen, aber nicht zur normalen Entwicklung bringen (Vergeilung). Die fortschreitende Unabhängigkeit vom Licht erreicht bei den Arten, die auch im Dunkeln in Gestalt und Funktion normale Fruchtkörper ausbilden, ihren Höhepunkt. Da allein die Gattung *Coprinus* Vertreter aller drei Gruppen liefert, scheint die Lichtabhängigkeit der Fruchtkörperbildung ebensowenig auf verwandtschaftliche Beziehungen hinzuweisen, wie bei niederen Pilzen etwa die unterschiedliche Abhängigkeit von der Zufuhr des Vitamins B<sub>1</sub>. Von *Coprinus lagopus* beschreibt zwar SCHENCK (1919) schon zwei „physiologische Rassen“ unterschiedlicher Lichtbedürftigkeit. Weil jedoch beide ohne Licht fruktifizieren, die „Rassenunterschiede“ also nur quantitativ sind und überdies andere morphogene Faktoren bei *Coprinus* mitspielen (BORRISS 1934), bezweifelt schon BORRISS, daß es sich hier um verschie-

<sup>1</sup> Der Ausgangsstamm *Ba* zeigte im Licht eine tagesrhythmische Anlage der Fruchtkörper in konzentrischen Ringen und damit noch eine gewisse Lichtabhängigkeit.

<sup>2</sup> Vergleiche Anmerkung S. 395.

dene Rassen handelt. In der vorliegenden Arbeit wird daher erstmals innerhalb einer Art ein qualitativer Unterschied festgestellt und durch Ermittlung des Erbgangs auf eine Mutation zurückgeführt. Damit ist nicht gesagt, daß es sich bei den Dunkelfruktifikationen anderer Hymenomycetenarten um Parallelmutationen handelt. Es wurde oben ausführlich dargelegt, wie grundlegend die Mutation *Fs* die Reaktionsnorm auf die für die Fruchtkörperbildung wichtigste Außenbedingung verändert. Die Ausprägung des Merkmals Dunkelfruktifikation wird dann merklich durch den genetischen Hintergrund und kaum durch die Außenfaktoren beeinflusst.

Der Sterilitätswirkung in den reinerbigen *Fs/Fs*-Paarungen können zweierlei genetische Gegebenheiten zugrunde liegen:

1. *Fs* ist ein dominanter Mendelfaktor mit rezessivem Sterilitätseffekt, oder

2. mit *Fs* ist ein rezessiver Sterilitätsfaktor eng gekoppelt.

Bei *Collybia velutipes* beruht nach ZATTLER (1924) die Braunfärbung der Einspormycelien auf additiver Polygenie zweier voneinander und von den Geschlechtsfaktoren unabhängig spaltender Mendelfaktoren. Bemerkenswert ist, daß die rein weiße, in beiden Genpaaren rezessive Rasse (*rv* × *rv*) zwar stets Schnallen bildet, diese jedoch vergleichsweise weniger ausgeprägt sind, und daß die Ausbildung von Fruchtkörpern oder auch nur deren Anlagen unterbleibt. Da jedoch im Freien, wenn auch sehr selten, Albinofruchtkörper von *C. velutipes* gefunden wurden, nimmt ZATTLER mit *r* und *v* eng gekoppelte Hemmungsfaktoren und deren Crossing-over an.

Berücksichtigt man aber, daß sogar bei Letalfaktoren „Durchbrenner“ auftreten (HADORN 1955), daß im Fall von *Fs* bei allerdings nur 45 *Fs/Fs*-Paarungen (Tab. 5, 7) kein „Faktorenaustausch“ vorkam, ferner daß auch viele biochemische Mutanten eine herabgesetzte Fähigkeit zur Dikaryotisierung und Schnallenbildung zeigen, so liegt die einfachere Annahme eines rezessiven Sterilitätsfaktors mit Dominanzeffekt näher<sup>1</sup>. Schließlich bringt nach LINDEGREN (1942) der einfache Aufbau und der Mangel differenzierter Strukturen es bei den Pilzen (*Neurospora*) mit sich, daß praktisch jedes Gen auch unspezifisch den gesamten Thallus und damit die Ausprägung jedes anderen Gens beeinflusst<sup>2</sup>. Da *Fs* (s. S. 406f.) außerdem in den *Fs/+*-Kreuzungen auf Entwicklungsgeschwindigkeit, Zahl, Größe und Aussehen der Fruchtkörper einwirkt, kann es als polyphäner Mendelfaktor gelten.

Die Anwesenheit beider mutierter Allele führt offensichtlich zu einer Störung im abgestimmten Gesamtgetriebe der Genwirkungen. Die

<sup>1</sup> Daher klein *s* in der Genbezeichnung *Fs*.

<sup>2</sup> Deshalb Phänotyp von Doppelmutanten bei *Neurospora* nicht vorhersagbar.

Sterilitätswirkung von Fs in doppelter Gendosis manifestiert sich nicht phasenspezifisch sondern mit fast 50% Ausprägungshäufigkeit bereits haplophasisch (heterokaryotisch?) bezüglich der Schnallenbildung und mit 100% dikaryotisch hinsichtlich einer vollständigen Fruchtkörperbildung. Beide Merkmale stehen ohnehin miteinander in Beziehung. Den Heterozygoten und trotz der Sterilitätswirkung auch ihren Nachkommen verleiht Fs mit seinem Manifestationsmuster im Freien nicht nur bei der Besiedelung neuer, lichtarmer Standorte vielleicht einen höheren Auslesewert.

Sterilitätsfaktoren sind bei *Neurospora* gut untersucht, bei den Hymenomyceeten bislang aber nur von ZATTLER (1924) bei *Collybia velutipes* (siehe oben) und GREIS (1942) bei *Solenia anomala* beschrieben. GREIS weist bei *Solenia* sogar fünf verschiedene, phasenspezifische, rezessive Sterilitätsfaktoren nach; in dieser Reihe von vielleicht multiplen Sterilitätsallelen verhindert auch einer jedwede Plasmogamie, also damit auch die Schnallenbildung, und ein weiterer macht auf späterer Entwicklungsstufe die Fruchtkörperbildung unmöglich. Bezeichnenderweise kommen hier die Anlagen nicht über basidienfreie Mycelpolster hinaus, und die Schnallenbildung ist, wenn nicht abnorm, so doch schwach ausgeprägt. Wenn allerdings GREIS im Anschluß an HARTMANN (1956) in dem Bestreben, die tetrapolare Sexualität der Hymenomyceeten auf ein bipolares Schema zurückzuführen, an die Stelle eines von KNEIPS kopulationsbedingenden Faktors Sterilitätsfaktoren setzt, die mehr als zwei Geschlechter vortäuschen sollen, so erwachsen dieser Annahme große Schwierigkeiten (KNEIP 1929/30).

Da das Gen Fs unabhängig von den Geschlechtsfaktoren A und B mendelt, kann es im III., „autosomalen“ Chromosom<sup>1</sup> lokalisiert werden: es ist also mit dem Zattlerschen Gen für Knäuelfruchtkörperbildung gekoppelt.

Wenn auch experimentelle, biochemische Mutanten bei Pilzen gezeigt haben, daß ein Gen die Synthesefähigkeit eines bestimmten, lebensnotwendigen Stoffes steuert, so darf aus der Tatsache, daß die Fruchtkörperbildung im Dunkeln ebenfalls durch einen Mendelfaktor kontrolliert wird, nicht auf eine ähnlich einfache, stoffliche Primärwirkung geschlossen werden. Gleichgültig, ob man dabei an die Bildung eines spezifischen Fruchtkörperbildungsstoffes oder an den Ausfall eines Hemmstoffes durch den Mutationsschritt denkt: in jedem Falle liegt er außerhalb der Wirkstoffe, die von einem in dieser Hinsicht doch sehr vielseitig zusammengesetzten Nährboden wie Malz- und Hefeextrakt her bekannt sind.

Die vorliegenden Untersuchungen haben verdeutlicht, wie Eintritt und Ablauf der Fruchtkörperbildung durch das Zusammenwirken von erblich festgelegten Potenzen mit bestimmten Gegebenheiten der Umwelt bedingt werden.

<sup>1</sup> In Übereinstimmung mit der bei *Drosophila* üblichen Verfahrensweise sollen die Geschlechtschromosomen mit dem Faktor A (= I.) und B (= II.) zuerst gezählt werden.



### Zusammenfassung

1. Licht ist der einzige Außenfaktor, der auf die Fruchtkörperbildung von *Schizophyllum commune* einen tiefgreifenden Einfluß ausübt.

2. Die Wirkung des Lichtes auf die Entwicklung der Fruchtkörper äußert sich in dreifacher Weise: 1. auslösend und fördernd, 2. formativ, 3. tropistisch.

3. Die von *Schizophyllum* bekannten, geweihartigen Gebilde sind als Schwachlichtformen normaler Fruchtkörper aufzufassen.

4. Zur Entfaltung der normalen Fruchtkörpergestalt und -funktion sind hohe Beleuchtungsstärken bzw. Lichtmengen von Sonnen- oder Glühlicht erforderlich.

5. Während die Fruchtkörperbildung aller bislang bekannt gewordenen *Schizophyllum*-Stämme ans Licht gebunden ist, vermag der Stamm *Ba* (Baarn) in völliger Dunkelheit normale Fruchtkörper zu bilden.

6. Erbgang und Aufspaltungszahlen zeigen, daß für diese besondere physiologische Fähigkeit ein dominantes Gen, Fs, verantwortlich ist.

7. Darüberhinaus bewirkt Fs in heterozygoten Fs/+-Paarungen polyphän eine Steigerung der Entwicklungsgeschwindigkeit, Zahl und Größe der Fruchtkörper sowie einen kennzeichnenden Habitus.

8. Eine rezessive Sterilitätswirkung des dominanten Mendelfaktors Fs manifestiert sich in der Mutationsrasse nicht phasenspezifisch mit annähernd 50% Ausprägungshäufigkeit haplophasisch hinsichtlich der Schnallenbildung, mit 100% dikaryotisch bezüglich einer vollständigen Fruchtkörperbildung.

9. Das Gen Fs ist nicht geschlechtsgekoppelt und kann im III., dem autosomalen Chromosom lokalisiert werden.

10. Stammkreuzungen sind am geeignetsten, um bei schlecht fruktifizierenden Stämmen zu guter Fruchtkörperbildung zu kommen; dies wird als Hinweis auf eine polygene Grundlage der Fruchtkörperbildung gedeutet.

Herrn Prof. Dr. R. HARDER danke ich für die Anregung zu diesen Untersuchungen sowie für die günstigen Arbeitsbedingungen am Göttinger Institut. Für Ratschläge und Diskussionen bei der Abfassung der Arbeit bin ich Herrn Dr. B. SCHWEMMLE sehr verbunden.

### Literatur

BADCOCK, E. C.: Methods for obtaining fructifications of wood-rotting fungi in culture. Trans. Brit. Mycol. Soc. **26**, 127—132 (1943). — BARNETT, H. L., and V. G. LILLY: The production of haploid and diploid fruit bodies of *Lenzites trabea* in culture. Proc. West Va. Acad. Sci. **19**, 34—39 (1949). — BAVENDAMM, W.: Erkennen, Nachweis und Kultur der holzverfärbenden und holzzersetzenden Pilze. Handb. biol. Arbeitsmethoden. Abt. 12: Teil 2, II. Spezielle Methoden Bd. 3, 927—1134. Berlin u. Wien 1939. — BIRKINSHAW, J. H., W. P. K. FINDLAY and R. A. WEBB: Biochemistry of wood-rotting fungi. 3. The production of methyl mercaptan by *Schizophyllum commune* Fr. Biochem. J. **36**, 526—529 (1942). — BORRIS, H.:



Über den Einfluß äußerer Faktoren auf Wachstum und Entwicklung der Fruchtkörper von *Coprinus lagopus*. *Planta* (Berl.) **22**, 644—684 (1934). — BREFELD, O.: Untersuchungen aus dem Gesamtgebiet der Mykologie. Bd. 8. Basidiomyceten III. 305 S. Leipzig 1889. — BRUNSWIK, H.: Untersuchungen über die Geschlechts- und Kernverhältnisse bei der Hymenomycetengattung *Coprinus*. *Bot. Abhandl.* (Goebel) **5**, 1—152 (1924). — BULLER, A. H. R.: The reactions of the fruit-bodies of *Lentinus lepideus* Fr. to external stimuli. *Ann. Bot.* **19**, 427—438 (1905). — The biology of *Polyporus squamosus*, a timber-destroying fungus. *J. Econ. Biol.* **1**, 101—138 (1906).

EHRLICH, H. G., and E. S. McDONOUGH: The nuclear history in the basidia and the basidiospores of *Schizophyllum commune* Fries. *Amer. J. Bot.* **36**, 360—363 (1949). — ENGLER, A.: Die natürlichen Pflanzenfamilien. 6. Bd., II. Abt. Eumycetes. Klasse: Basidiomycetes. Leipzig 1928.

FALCK, R.: Die Lenzites-Fäule des Coniferenholzes. Hausschwammforschungen **3**, 234 S. Jena 1909. — Die Fruchtkörperbildung der im Hause vorkommenden holzerstörenden Pilze in Reinkulturen und ihre Bedingungen. *Mykol. Unters. u. Ber.* **1**, 47—66. 2. Aufl. Kassel 1923.

GREIS, H.: Relative Sexualität und Sterilisationsfaktoren bei dem Hymenomyceten *Solenia*. *Biol. Zbl.* **62**, 46—92 (1942). Bericht in HARTMANN (1956).

HADORN, E.: Letalfaktoren in ihrer Bedeutung für Erbpathologie und Genphysiologie der Entwicklung. Stuttgart 1955. — HARDER, R.: Zur Frage nach der Rolle von Kern und Protoplasma im Zellgeschehen und bei der Übertragung von Eigenschaften. *Z. Bot.* **19**, 337—407 (1927). Kürzer in: Über Merogonieversuche an Pilzen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **44**, 20f. (1926). — HARTMANN, M.: Die Sexualität. Stuttgart 1956. — HAWKER, L. E.: Physiology of fungi. London 1950. — HELDMAIER, C.: Über die Beeinflussbarkeit der Sexualität von *Schizophyllum commune* (Fr.) und *Collybia velutipes* (Curt.). *Z. Bot.* **22**, 161—220 (1929/30).

KAPPERT, H.: Heterosis und Inzuchtfragen. *Züchter* **2**, 358—368 (1930). — KLEBS, G.: Zur Physiologie der Fortpflanzung einiger Pilze. III. Allgemeine Betrachtungen. *J. Bot.* **35**, 80—203 (1900). — KNIEP, H.: Über die Bedingungen der Schnallenbildung bei den Basidiomyceten. *Flora, N. F.* **11**, 380—395 (1918). — Über morphologische und physiologische Geschlechtsdifferenzierung. (Untersuchungen an Basidiomyceten). *Verh. Physik.-Med. Ges. Würzb.* **46**, 1—18 (1920). — Über Geschlechtsbestimmung und Reduktionsteilung. *Verh. Physik.-Med. Ges. Würzb.* **47**, 1—29 (1922). — Über erbliche Änderungen von Geschlechtsfaktoren bei Pilzen. *Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **31**, 170—183 (1923). Bericht in *Z. induct. Abstamm.- u. Vererb.-Lehre* **30**, 268—271 (1923). — Die Sexualität der niederen Pflanzen. 544 S. Jena 1928. — Vererbungserscheinungen bei Pilzen. *Bibliogr. Genet.* **5**, 371—478 (1929). — Die „multipolare“ Sexualität der Hymenomyceten und deren Deutung durch M. HARTMANN. *Z. Bot.* **22**, 266—273 (1929/30). — Über Selektionswirkungen in fortlaufenden Massenaussaaten von *Schizophyllum*. *Z. Bot.* **23**, 510—536 (1930).

LILLY, V. G., and H. L. BARNETT: Physiology of the fungi. New York, Toronto, London 1951. — LINDEGREN, C. C.: The use of the fungi in modern genetical analysis. *Iowa State Coll. J. Sci.* **16**, 271—290 (1942). — LONG, W. H., and R. M. HARSCH: Pure cultures of wood-rotting fungi on artificial media. *J. Agric. Res.* **12**, 33—82 (1918).

MADÉLIN, M. F.: The influence of light and temperature on fruiting of *Coprinus lagopus* Fr. in pure culture. *Ann. Bot., N. S.* **20**, 467—480 (1956). — MÜNCH, E.: Über die Lebensweise des „Winterpilzes“, *Collybia velutipes* Curt. *Naturwiss. Z. Forst- u. Landwirtsch.* **7**, 569—577 (1909).

OORT, A. J. P.: Die Sexualität von *Coprinus fimetarius*. *Rec. Trav. Bot. néerl.* **27**, 85—148 (1930).

PAPAZIAN, H. P.: The incompatibility factors in *Schizophyllum commune*. Amer. J. Bot. **36**, 813 (1949). — A method of isolating the four spores from a single basidium in *Schizophyllum commune*. Bot. Gaz. **112**, 139 f. (1950 a). — Physiology of the incompatibility factors in *Schizophyllum commune*. Bot. Gaz. **112**, 143—163 (1950 b). — The incompatibility factors and a related gene in *Schizophyllum commune*. Genetics **36**, 441—459 (1951). — PLUNKETT, B. E.: Nutritional and other aspects of fruit-body production in pure cultures of *Collybia velutipes* (Curt.) Fr. Ann. Bot., N. S. **17**, 193—217 (1953). — The aeration complex of factors and fruit-body formation in pure cultures of hymenomycetes. Huitième Congrès international de Botanique. Rapports et communications. Sec. 19, 101 f. Paris 1954. — The influence of factors of the aeration complex and light upon fruit-body form in pure cultures of an agaric and a polypore. Ann. Bot., N. S. **20**, 563—586 (1956).

RAPER, J. R., and J. P. SAN ANTONIO: Heterokaryotic mutagenesis in the tetrapolar fungus *Schizophyllum*. Records Genetics Soc. Amer. 1952, 60. — Heterokaryotic mutagenesis in hymenomycetes. I. Heterokaryosis in *Schizophyllum commune*. Amer. J. Bot. **41**, 69—86 (1954). — ROBBINS, W. J.: Organisms requiring vitamin B<sub>1</sub>. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) **24**, 53—56 (1938). — ROBBINS, W. J., and F. KAVANAGH: Vitamin B<sub>1</sub> or its intermediates and the growth of certain fungi. Amer. J. Bot. **25**, 229—236 (1938).

SCHENCK, E.: Die Fruchtkörperbildung bei einigen *Bolbitius*- und *Coprinus*-arten. Beih. Bot. Zbl. **36**, 355—413 (1919). — SCHOPFER, W. H., et S. BLUMER: Le pouvoir de synthèse d'un facteur de croissance par *Schizophyllum commune* (haplontes et diplonte). Protoplasma (Wien) **34**, 524—532 (1940).

TAKEMARU, T.: Genetics of *Collybia velutipes*. I. Mating type and barrage phenomenon. Bot. Mag. (Tokyo) **67**, 23—27 u. 82—86 (1954).

WAKEFIELD, E. M.: Über die Bedingungen der Fruchtkörperbildung sowie das Auftreten fertiler und steriler Stämme bei Hymenomyceten. Naturwiss. Z. Forst- u. Landwirtschaft. **7**, 521—551 (1909). — WAKEFIELD, E. M., and R. W. G. DENNIS: Common British fungi. London: P. R. Gawthorn.

ZÄTTLER, F.: Vererbungsstudien an Hutpilzen (Basidiomyceten). Z. Bot. **16**, 433 bis 499 (1924).

(Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Freien Universität Berlin)

## Fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an *Beggiatoa alba* und *Thiothrix nivea*

### VI. Mitteilung der Reihe: Zellmorphologische und zellphysiologische Studien an Cyanophyceen

Von

HORST DRAWERT und INGEBORG METZNER-KÜSTER

Mit 12 Textabbildungen

(Eingegangen am 28. Juli 1958)

Die farblosen fädigen Schwefelmikroben müssen wir ohne Zweifel zu den Cyanophyceen und nicht zu den Bakterien einreihen (PRINGSHEIM 1949, HARDER 1954, RIPPEL-BALDES 1955). Diese Auffassung haben kürzlich BAHR u. SCHWARTZ (1957) durch vergleichende cytologische Untersuchungen an *Beggiatoa* und *Thiothrix* sowie an *Oscillatoria* und *Phormidium* zu stützen versucht. Ein kurzer Hinweis findet sich auch bei v. ZASTROW (1953). Da wir bei unseren laufenden Untersuchungen an Cyanophyceen ebenfalls Parallelversuche mit *Beggiatoa alba* (Vauch.) Trev. und *Thiothrix nivea* (Rabenh.) Winogr. durchführten, sollen unsere bisherigen Ergebnisse kurz dargestellt werden.

Die benutzten Mikroben wurden ihren natürlichen Standorten direkt entnommen. *Beggiatoa alba* entwickelt sich mehr oder weniger üppig in einem kleinen Wasserbecken auf verrottetem Kuhdung in einer dunklen Ecke des hiesigen Warmhauses. *Thiothrix nivea* überzieht in jedem Frühjahr in dichten Rasen *Helodea canadensis*-Sprosse in einem Freilandbecken, das im Winter zugedeckt und mit Laub abgedeckt wird.

Zur Vitalfärbung dienten Acridinorange (Merck), Berberinsulfat (Merck), Neutralrot (Merck), Nilblausulfat (Grübler), Toluidinblau (Merck), Methylenblau (Merck). Ferner wurden Reaktionen mit dem Nadi-Gemisch und 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (Merck) durchgeführt. Die Vitalfarbstoffe wurden allgemein in Lösungen 1:10000 in Leitungs- oder in destilliertem Wasser angewandt.

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen der Wandstruktur erwies sich als beste Methode eine dreitägige Vorbehandlung der Zellfäden mit abs. Alkohol, da sich hierbei der Schwefel bis auf geringe Reste löste. Daran schloß sich eine fünfständige Einwirkung von 50% Chromsäure an. Bei *Thiothrix* war eine mehrtägige Behandlung mit 20% Chromsäure besonders günstig.

Zur Darstellung des Zellinnern wurden die Fäden mit 1% OsO<sub>4</sub> bei pH 7,2 fixiert und in der üblichen Weise in Plexiglas oder in Vinox N 5 (Procédé Vinox Laboratoire du Dr. Walmar Schwab, Genève) eingebettet und mit dem Mikrotom nach Sjöstrand Typ LKB 3314 oder mit dem Servall-Mikrotom nach Porter-Blum unter Verwendung von Glasmessern geschnitten. Teilweise erfolgte eine Kontrastierung mit Phosphorwolframsäure (WOHLFARTH-BOTTERMANN 1957). Die Untersuchungen erfolgten mit dem Siemens-Stativ ELM II.

### A. Licht- und fluoreszenzmikroskopischer Teil

Im Blaulicht (Sperrfilter OG4 + OG5) zeigen die Fäden von *Beggiatoa* und *Thiothrix* nur eine ganz schwache homogene Eigenfluoreszenz. Eine gelbrötliche Eigenfluoreszenz der Schwefeltröpfchen, wie sie von BAHR u. SCHWARTZ (1957) angegeben wird, konnte mit der von uns benutzten Fluoreszenzeinrichtung (Zeiß-Winkel, Quecksilberhöchstdruckbrenner HBO 200) nicht beobachtet werden. Im Polarisationsmikroskop lassen die Schwefeltröpfchen das typische Sphäritenkreuz erkennen, außerdem weisen die Längswände (Scheiden) eine äußerst schwache Doppelbrechung auf. Dagegen konnte bisher zum Unterschied von *Oscillatoria* (ULRICH 1929, DRAWERT 1949, METZNER 1955) keine Doppelbrechung der Querwände beobachtet werden. Wie schon oft beschrieben worden ist, sind die Querwände in den schwefelführenden Fäden auch im normalen Lichtmikroskop meist nicht zu erkennen. Bei *Beg. alba* treten sie aber sehr deutlich hervor, wenn man die Zellen auf dem Objektträger eintrocknen und nach Zugabe von Wasser wieder turgescent werden läßt. Mit Jod-Jodkalium färbt sich der Zellinhalt entsprechend dem der *Oscillatorien* mahagonibraun, so daß die Zellen reich an Glykogen sein dürften.

Mit den Farbstoffen ergaben die Zellen im einzelnen folgende Reaktionen.

#### *Acridinorange*

Bei den normalen Cyanophyceen läßt sich mit Acridinorange die „Zentralsubstanz“ elektiv grün fluorochromieren (v. ZASTROW 1953, KRIEG 1954, DRAWERT u. METZNER 1956, BAHR u. SCHWARTZ 1957). Bei der durch Keritomie veränderten *Oscillatoria Borneti* ist dies allerdings nicht möglich, hier färbt sich das gesamte Plasma (DRAWERT u. METZNER 1958). Schwefelfreie *Beggiatoa*- und *Thiothrix*-Fäden zeigen nach BAHR u. SCHWARTZ nach Acridinorange-Behandlung „einen zentralen, besonders in seinen Randzonen kräftig gelb-grün fluoreszierenden Strang“. v. ZASTROW konnte dagegen — allerdings bei *Beggiatoa mirabilis* — keinen „basophilen Bereich, der der Zentralsubstanz der typischen Cyanophyceenzelle entsprechen konnte“, nachweisen.

Nach unseren eigenen Untersuchungen fluoresciert in den Zellen von *Beg. alba* eine Art Zentralsubstanz zunächst grün. Zum Unterschied von *Oscillatoria* nimmt hier die „Zentralsubstanz“ aber einen viel größeren Raum der Zelle ein, nur ein schmaler, peripherer Bereich bleibt ohne Fluoreszenz (Abb. 1). Diese „Zentralsubstanz“ kann eine mehr oder weniger homogene, eine granuläre, eine zerklüftete oder auch fadenknäuelartige Struktur besitzen, und zwar unabhängig vom Schwefelgehalt. Bei längerer Farbstoffeinwirkung schlägt die Fluoreszenz allmählich von Grün über Gelb nach Kupferrot um. Im Gegensatz zu



*Oscillatoria Borneti* kann keine Fluoreszenz der Querwände beobachtet werden. In der Intensität der Fluoreszenz können sich die Zellen eines Fadens unterscheiden.

Bei *Thiothrix nivea* leuchtet der ganze Protoplast homogen oder granuliert grün. Die vorher im normalen Lichtmikroskop nicht zu erkennenden Querwände heben sich im Fluoreszenzmikroskop als dunkle Streifen deutlich vom leuchtenden Plasma ab (Abb. 2). In den schwefelhaltigen Fäden bleiben die Schwefeltröpfchen dunkel ausgespart.



Abb. 1



Abb. 2

Abb. 1. Schwefelfreie Zellen von *Beggiatoa alba* mit Acridinorange vital fluorochromiert. Grüne Fluoreszenz der „Zentralsubstanz“

Abb. 2. Schwefelfreie Zellen von *Thiothrix nivea* mit Acridinorange vital fluorochromiert. Grüne Fluoreszenz der ganzen Protoplasten. Die sonst nicht zu erkennenden Querwände heben sich deutlich von den leuchtenden Protoplasten ab

### *Berberinsulfat*

Mit Berberinsulfat läßt sich weder eine Zentralsubstanz elektiv fluorochromieren, wie es bei den normalen Cyanophyceen möglich ist (DRAWERT u. METZNER 1956), noch tritt eine Granulafluoreszenz auf, wie sie von KRIEG (1954) für Blaualgen beschrieben wird (vgl. aber DRAWERT u. METZNER 1956). Es ist nur eine homogene gelbe Fluoreszenz des ganzen Protoplasten mit Ausnahme der Schwefeleschlüsse zu beobachten.

### *Methylenblau und Toluidinblau*

Bei einer Behandlung der lebenden Fäden mit diesen beiden basischen Farbstoffen tritt sowohl bei *Beggiatoa* wie bei *Thiothrix* eine diffuse blaue (Methylenblau) oder violette (Toluidinblau) Färbung auf. Eine Entscheidung darüber, was im einzelnen gefärbt ist, war uns nicht möglich. Werden mit Methylenblau gefärbte Cyanophyceen nach GEITLER (1925, S. 46) mit 1%  $H_2SO_4$  behandelt, so erhält man eine elektive Färbung der Metachromatinkörperchen und nach Zugabe von 0,5% KOH vorwiegend eine Färbung der Zentralsubstanz (vgl. DRAWERT 1949, TISCHER 1957). Werden *Beggiatoa* und *Thiothrix* ebenso behandelt, dann tritt nach  $H_2SO_4$ -Zugabe eine völlige Entfärbung ein und nach KOH-Zugabe werden die Fäden intensiv dunkelviolet und der Zellinhalt zeigt eine „wolkige“ Färbung, die Querwände sind etwas stärker gefärbt. Eine „Zentralsubstanz“ hebt sich nicht durch eine intensivere Färbung hervor.

Während der Beobachtung blassen auch in KOH plötzlich die Fäden ab und werden völlig farblos. *Metachromatinkörperchen konnten weder bei Beggiatoa noch bei Thiothrix nachgewiesen werden.* Eine stärkere Färbung der „Zentralsubstanz“ mit blauem Farbton setzt aber bei *Beggiatoa* ein, wenn die Fäden in der wäßrigen Methylenblaulösung absterben.

### *Feulgen-Reaktion*

Seit den Untersuchungen von POLJANSKY u. PETRUSCHEWSKY (1929) sind an den Cyanophyceen mit der Feulgenschen Nuclealreaktion häufiger positive Ergebnisse erzielt worden; allerdings verläuft die Reaktion nicht immer positiv (Literatur siehe bei DRAWERT 1949 und TISCHER 1957). Für *Beggiatoaceen* beschreiben DELAPORTE (1939) sowie BAHR u. SCHWARTZ Färbungen, die sie mit der Nuclealreaktion erhalten haben. Nach PETTER (1933) soll nur eine schwache und diffuse Plasmafärbung zu beobachten sein. In den eigenen Untersuchungen konnte trotz vielseitigster Variation der Methode<sup>1</sup> weder bei *Beg. alba* noch bei *Thiothrix* ein Chromidialapparat nachgewiesen werden. Nach DEVIDÉ (1954, zit. nach GEITLER 1955) sollen bei den Schwefelbakterien Nucleinsäuren nur diffus in der Zelle vorhanden sein.

### *Neutralrot*

Mit Neutralrot färben sich bei Cyanophyceen bereits vorhandene Vacuolen bzw. werden auch erst Vacuolen unter dem Einfluß des Farbstoffes gebildet (Literatur bei v. ZASTROW 1953, vgl. auch DRAWERT u. METZNER 1956). Für *Beg. mirabilis* beschreibt v. ZASTROW eine Vitalfärbung bereits vorhandener Vacuolen mit Neutralrot. Weder bei *Beg. alba* noch bei *Thiothrix nivea* sind Vacuolen zu beobachten. Auch nach einer Vitalfärbung mit Neutralrot sind keine Vacuolen zu erkennen, die Fäden zeigen nur eine diffuse, zarte, rosa Färbung. Dies trifft sowohl für schwefelhaltige wie für schwefelfreie Zellen zu. Im Blaulicht weisen die Zellen eine diffuse gelbe Plasmafluorescenz auf, die bei längerer Strahlenwirkung in Grüngelb übergeht und mehr granulär wird.

### *Nadi- und TTC-Reaktion*

Zur Prüfung des Oxydations- und Reduktionsvermögens wurde mit *Beg. alba* die Nadi-Reaktion (PERNER 1952) durchgeführt und die Reduktion von 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) untersucht. Beide Reaktionen erfolgten, von der mikroskopischen Beobachtung abgesehen, im Dunkeln. In Cyanophyceen färben sich bei der Nadi-Reaktion Granula mit Indophenolblau (GUILLIERMOND 1926, 1933; DELAPORTE 1939; DREWS u. NIKLOWITZ 1956, 1957; TISCHER 1957). Das gleiche ist bei *Beggiatoa* der Fall. Hier treten in den Zellen so viele kleine gefärbte

<sup>1</sup> Fräulein Dr. EVA SCHLAFKE danken wir für die Durchführung dieser Versuche.

Granula in Erscheinung, daß bei schwächerer Vergrößerung die Schwefeltröpfchen in einer homogen blavioletten Masse zu liegen scheinen. Die Zellen sterben aber sehr rasch ab. Die Fäden zerfallen in kurzer Zeit, und das Plasma tritt aus den Zellen aus; dadurch werden neben den Schwefeltröpfchen die blavioletten Indophenolblau-Granula freigelegt.

Die TTC-Reaktion verlief dagegen meist negativ. Nur an einem Tag entstanden im Dunkeln in den Zellen scharf umgrenzte rote Formazan-Granula. Auch TTC ist für *Beggiatoa* sehr giftig, so daß die Fäden in der Lösung sehr rasch zerfallen.

### Nilblau

Die vielen tröpfchenartigen Indophenolblau-Granula bei der Nadi-Reaktion deuten bereits darauf hin, daß die Zellen sehr lipoidreich sein müssen. Zur Prüfung dieser Frage wurden deshalb noch Fluorochromierungen mit Nilblau durchgeführt. Ältere wäßrige Lösungen von Nilblau bedingen eine elektive, goldgelbe Fluoreszenz der lipoidhaltigen Bestandteile einer Zelle. Diese Fluorochromierung erfolgt bei der Verwendung älterer Lösungen unabhängig von der Sauerstofftension (DRAWERT 1952, 1953) und ist auf den Gehalt der Nilblaulösung an Nilrot zurückzuführen, das allmählich in der wäßrigen Lösung durch Oxydationsprozesse entsteht (DRAWERT u. GUTZ 1953, GUTZ 1956, MIX 1958). An Cyanophyceen hat TISCHER (1957) mit Nilblau fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Hier wurde aber das Nilblau nur als Redox-Indicator angewandt, also die von der  $O_2$ -Tension abhängige Fluoreszenz untersucht.

Bei *Beggiatoa* und *Thiothrix* erhält man im Hellfeld mit Nilblau ein Färbungsbild, das dem einer Vitalfärbung mit Methylen- oder Toluidinblau entspricht. Die Fäden sind diffus violettblau mit rötlichen „Wolken“ im Zellinnern gefärbt. Diese intensiv gefärbten Fäden zeigen im Blaulicht

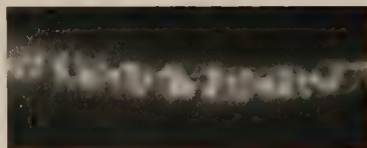


Abb. 3

Schwefelführende Zellen von *Beggiatoa alba* mit intensiver Granulafluoreszenz nach einer Vitalfärbung mit älterer Nilblaulösung

keine Fluoreszenz und bei *Beg.* auch keine Bewegung mehr. Nicht überfärbte und bei *Beg.* noch bewegliche Fäden weisen aber im Blaulicht eine sehr intensive goldgelbe Granulafluoreszenz auf (Abb. 3). Bei *Thiothrix* handelt es sich allerdings weniger um Granula, hier scheint der ganze Protoplast zu fluorescieren, in dem sich nur die Schwefeltröpfchen dunkel abheben. Beide untersuchten Arten zeigen die Lipoidfluoreszenz nur, so lange die Zellen Schwefel führen. Schwefelfreie Zellen sind ohne Fluoreszenz, sind also wohl lipoidfrei. Aus den Fluoreszenzbildern zu schließen, besteht eine direkte Parallele zwischen Schwefel- und Lipoidgehalt.

*Sudanschwarz B*

Nach unseren bisherigen Kenntnissen ist die Nilotfluoreszenz eine elektive Reaktion auf lipoidhaltige Strukturen. Zur Sicherung dieser Schlußfolgerungen führten wir noch an *Beggiatoa* Färbungen mit alkoholischen Lösungen von Sudanschwarz B durch. Dieser Farbstoff bedingt in den schwefelhaltigen Zellen eine intensive grauschwarze Färbung des Plasmas. Die Färbung ist entweder granuliert, zum Teil sind auch grauschwarze tropfenartige Gebilde zu erkennen, oder die Schwefeltröpfchen liegen in einer homogen grauschwarzen Masse eingebettet. Um die Schwefeltröpfchen erscheint die Färbung des Plasmas intensiver, dabei kann es sich aber um einen optischen Effekt handeln, der durch die Linsenwirkung der Schwefeltröpfchen bedingt wird. Die Intensität der Färbung ist um so geringer, je weniger Schwefel die Zellen führen. Schwefelfreie Fäden bleiben völlig farblos. Die Glykogenreaktion mit Jod verläuft dagegen unverändert.

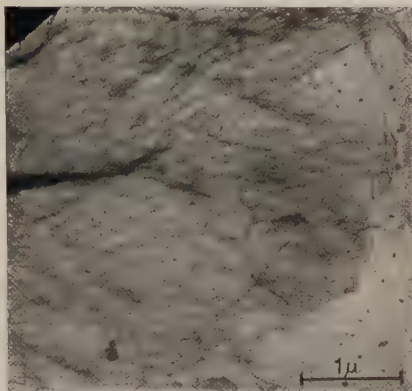


Abb. 4. *Beggiatoa alba* nach 50stündiger Behandlung mit 10% Chromsäure und anschließender Beschallung. Die Scheide ist aufgerissen und zeigt klar das dichte ineinander verwobene Fibrillengeflecht. Vergr. 7600 auf 14500 nachvergrößert

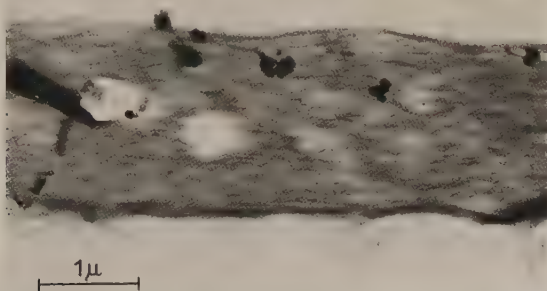


Abb. 5. *Beggiatoa alba* nach 50stündiger Behandlung mit 10% Chromsäure. Das Fibrillengeflecht der Scheide läßt eine schwache Längsorientierung erkennen. Vergr. 7600 auf 14500 nachvergrößert

**B. Elektronenmikroskopischer Teil***Scheide*

Die Scheiden der bisher daraufhin untersuchten Cyanophyceen besitzen eine Faserstruktur (METZNER 1955). Denselben Bau weisen auch die Scheiden von *Beggiatoa* und *Thiothrix* auf. Wie Abb. 4 belegt, ähnelt



die Scheidenstruktur von *Beg.* der von *Oscillatoria*, nur daß bei *Beg.* das feine Fibrillengeflecht eine schwache Längsorientierung erkennen läßt



Abb. 6. *Thiothrix nivea* nach 2tägiger Behandlung mit abs. Alkohol und anschließender 2tägiger Einwirkung von 20% Chromsäure. Die dichten Faserstränge der Scheide sind deutlich parallel zueinander orientiert. Feine Mikro fibrillen sind quer zur Längsachse eingewoben. Vergr. 15 400

(Abb. 5). Der Durchmesser der Mikro fibrillen beträgt  $\sim 6-13 \mu$ . Die Scheiden von *Thiothrix* zeigen dagegen in der Struktur mehr Übereinstimmung mit denen von *Lyngbya* mit ihrer ausgeprägten Längsorientierung (Abb. 6). Hier beträgt der Durchmesser der Mikro fibrillen  $\sim 10 \mu$ .

### Zellwand

Zum Unterschied zu den früher untersuchten Cyanophyceen konnten wir eine Zweischichtigkeit der Längswände weder bei *Beggiatoa* noch bei *Thiothrix* einwandfrei nachweisen. In den Schnittpräparaten sind zwar Andeutungen zu erkennen, doch reichen diese nicht aus, um mit Sicherheit auf eine Zweischichtigkeit zu schließen.

Die Längs- und auch die Querwände von *Beg.* sind von Poren mit einem Durchmesser von  $\sim 13 \mu$  in zerstreuter Anordnung durchsetzt. In den Querwänden treten diese Poren aber nicht mit der Klarheit



Abb. 7. *Beggiatoa alba* nach 2tägiger Behandlung mit abs. Alkohol und anschließender 5stündiger Einwirkung von 30% Chromsäure. In den Außenwänden befindet sich zu beiden Seiten der Ansatzstellen der Querwände je eine Porenkette. Porenweite  $\sim 13 \mu$ . Vergr. 15 400 auf 64500 nachvergrößert

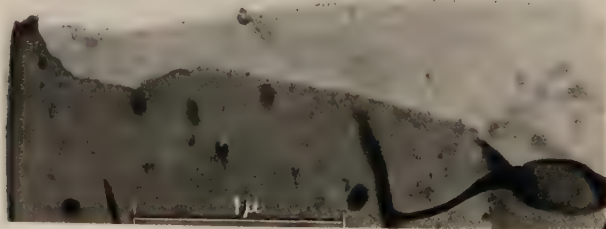


Abb. 8. *Beggiatoa alba* nach 3tägiger Behandlung mit abs. Alkohol und anschließender 5stündiger Einwirkung von 30% Chromsäure und einer kurzen Beschallung. Die Zellwände reißen bevorzugt in den Porenketten ab. Unterhalb der aufgerissenen Porenkette die fein perforierte Längswand. Vergr. 15 400 auf 30800 nachvergrößert

hervor, wie es bei den bisher geprüften Cyanophyceen der Fall ist. Entsprechend den anderen freibeweglichen Arten weist aber *Beggiatoa* in den Längswänden zu beiden Seiten der Ansatzstelle einer Querwand ein sehr klares regelmäßiges Porensystem auf (Abb. 7 u. 8.). Die Porenweite liegt bei  $\sim 13 \mu$ . Bis jetzt sind drei verschiedene Typen dieses Porensystems bekannt: der *Oscillatoria sancta*-Typ zeichnet sich durch eine einfache

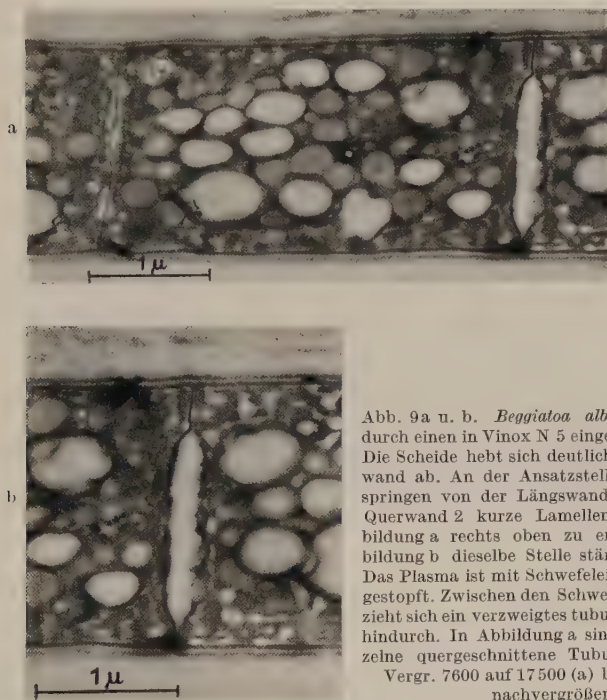


Abb. 9a u. b. *Beggiatoa alba*. Längsschnitt durch einen in Vinox N 5 eingebetteten Faden. Die Scheide hebt sich deutlich von der Längswand ab. An der Ansatzstelle der Querwand springen von der Längswand aus parallel zur Querwand 2 kurze Lamellen vor. (In Abbildung a rechts oben zu erkennen, in Abbildung b dieselbe Stelle stärker vergrößert.) Das Plasma ist mit Schwefeleinschlüssen vollgestopft. Zwischen den Schwefeleinlagerungen zieht sich ein verzweigtes tubuliartiges System hindurch. In Abbildung a sind links oben einzelne querschnittene Tubuli zu erkennen. Vergr. 7600 auf 17500 (a) bzw. 20500 (b) nachvergrößert

Porenkette aus (METZNER 1955); für den *Cylindrospermum*-Typ ist ein breiterer Porengürtel charakteristisch (DRAWERT u. METZNER 1956), und der *Osc. Borneti*-Typ vereinigt die Porenkette mit dem Porengürtel (DRAWERT u. METZNER 1958). *Beg. alba* gehört demnach zum *Osc. sancta*-Typ.

Bei *Thiothrix nivea* erscheinen die Zellwände sehr homogen. Vor allem haben wir entsprechend der Unbeweglichkeit dieser Schwefelmikrobe nie eine Porenkette oder einen Porengürtel in den Längswänden nachweisen können.

In Längsschnitten durch *Beg.* hebt sich die Scheide klar von der Zellwand ab (Abb. 9a, b u. 10). Die Querwände sind deutlich einschichtig. An der Ansatzstelle der Querwand springt aber von der Längswand zu

beiden Seiten der Querwand und parallel zu ihr je eine kurze Lamelle vor (Abb. 9a u. b). Auffallend ist die Tatsache, daß nie eindeutig Ansätze neuer Querwände zu erkennen sind, während für *Oscillatoria* diese unvollständigen neuen Querwände so charakteristisch sind.

### *Protoplast*

An Längs- und Querschnitten durch *Beg.* sind — abgesehen von den Schwefeileinschlüssen — im Zellinnern keine Granula zu erkennen. Größere Schwefeltropfchen scheinen manchmal andeutungsweise von

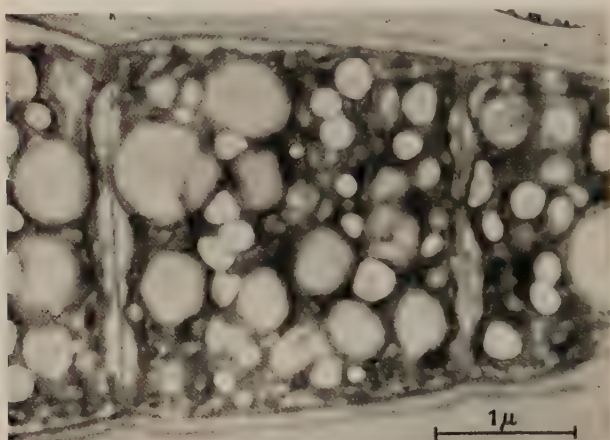


Abb. 10. *Beggiatoa alba*. Längsschnitt durch einen in Methacrylat eingebetteten Faden. Das tubuliartige System ist besonders deutlich im Bereich der Querwände zu erkennen. Um einzelne größere Schwefeileinschlüsse liegen 3—4 Lamellenschichten. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um zusammengedrückte Tubuli. Vergr. 15 400 auf 20 000 nachvergrößert

einer Membran umgeben zu sein. Hierbei handelt es sich aber wohl nur um eine, durch die Ausdehnung der Schwefeltropfchen rein mechanisch bedingte, Plasmaverdichtung. Das Plasma scheint ein verzweigtes tubuliartiges System zu durchsetzen (Abb. 9 u. 10). Ein ausgeprägtes Lamellensystem, wie es die chlorophyllführenden Cyanophyceen und selbst noch die chlorophyllärmere *Osc. Borneti* (DRAWERT u. METZNER 1958) besitzen, konnten wir bei *Beg.* nie eindeutig erkennen. Allerdings erscheinen manchmal an der Grenze einzelner größerer Schwefeltropfen 2—3, höchstens 4 Lamellen, die mehr oder weniger parallel zueinander liegen (Abb. 10). Aller Wahrscheinlichkeit nach handelt es sich aber hierbei um Tubuli, die von den Schwefeltropfen zusammengedrückt worden sind.

Ob die hellere Zone zu beiden Seiten der Querwände (Abb. 9a links, Abb. 10) eine natürliche Struktur oder ein Artefakt darstellt, wagen wir noch nicht zu entscheiden.



*Die Zelle von Beg. alba* läßt elektronenmikroskopisch keine Differenzierung in bestimmte Organelle erkennen.

Bei *Th. nivea* scheint der Protoplast etwas differenzierter zu sein als bei *Beg.* Besonders an Querschnitten ist ein meist zentral gelegenes alveolares System auffallend (Abb. 11). Besonders in den schwefelarmen Zellen erscheinen hier manchmal osmiophile „Granula“ (Abb. 12, linke Zelle), die aber bei entsprechender Schnittrichtung mehr eine Säulenform erkennen lassen. Diese „Säulen“ scheinen aus übereinander geschichteten Lamellen aufgebaut zu sein (Abb. 12, rechte Zelle). Andeutungen eines Tubulsystems sind vorhanden, doch ist das Bild nicht so klar wie bei *Beggiatoa*.

### C. Besprechung der Ergebnisse

Bei den fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen ist es zum Unterschied von den chlorophyllführenden Cyanophyceen auffallend, daß sich nur bei *Beg. alba* eine „Zentralsubstanz“ mit Acridinorange nachweisen läßt. Dies gelingt weder mit Methyleneblau + KOH noch mit der Feulgen-Reaktion. Bei *Thiothrix nivea* versagt auch Acridinorange, da sich hier der ganze Protoplast fluorochromiert. Diese Erscheinung hat aber ihre Parallele im Verhalten von *Oscillatoria Borneti*. Ferner steht sie im Einklang mit den Angaben von PETTER (1933) und DEVIDÉ (1954), daß bei Schwefelbakterien die Nucleinsäuren diffus im Plasma verteilt sein sollen (vgl. aber dagegen DELAPORTE 1939 sowie BÄHR u. SCHWARTZ 1957).

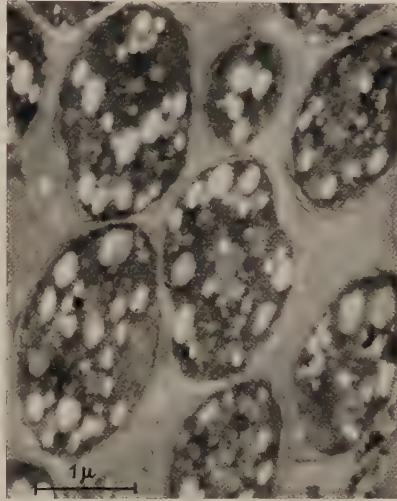


Abb. 11. *Thiothrix nivea*. Querschnitte durch Fäden, die in Vinox N 5 eingebettet waren. Kontrastierung mit Phosphorwolframsäure. Im Innern der Zellen hebt sich deutlich ein „Alveolarsystem“ ab. Vergr. 7600 auf 14 500 nachvergrößert

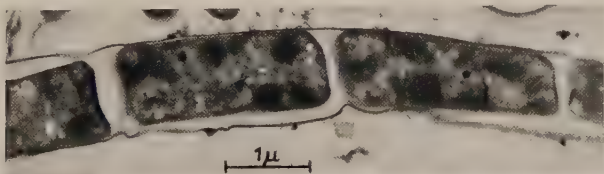


Abb. 12. *Thiothrix nivea*. Längsschnitt durch einen in Vinox N 5 eingebetteten schwefelfreien Faden. Kontrastierung mit Phosphorwolframsäure. Die geschrumpften Protoplasten zeigen in der linken Zelle osmiophile „Granula“, die aber in der rechten Zelle als lamellierte, säulenförmige Gebilde erscheinen. Auch das „Alveolarsystem“ ist schwach zu erkennen. Vergr. 7600 auf 12300 nachvergrößert



Ferner konnten wir bei den Schwefelmikroben nie Metachromatinkörperchen nachweisen, die einen ganz charakteristischen Bestandteil der normalen Cyanophyceen-Zelle darstellen. Aber auch hier besteht eine Parallele zu *Osc. Borneti*, deren Zellen nur wenige oder gar keine Metachromatinkörperchen führen. Auch bei den übrigen Cyanophyceen kann bei Phosphormangel die Bildung von Metachromatinkörperchen ausbleiben.

Die Indophenolblau-, Nilrot- und Sudanschwarz B-Reaktionen weisen aber darauf hin, daß die untersuchten Schwefelmikroben sehr lipoidreich sein müssen, so lange sie Schwefel führen. Von besonderem Interesse in stoffwechselphysiologischer Hinsicht ist die Abnahme des Lipidgehaltes mit dem Verschwinden der Schwefelein schlüsse. Hier scheint ein direkter Zusammenhang zu bestehen, dem nachzugehen es sich verlohnen würde.

Im elektronenmikroskopischen Bild ist bei *Beg. alba* das Fehlen jeglicher Granula und eines geordneten Lamellensystems, wie es die chlorophyllführenden Cyanophyceen besitzen, auffällig. Nach unseren bisherigen Kenntnissen ist der Photosyntheseapparat morphologisch immer an ein Lamellensystem gebunden. Dafür sprechen auch die Befunde von NIKLOWITZ u. DREWS (1955) an *Rhodospirillum rubrum* (vgl. aber VATTER u. WOLFE 1958). Der Chemosyntheseapparat von *Beg.* scheint dagegen kein Lamellensystem zu benötigen. Allerdings weisen die Zellen von *Thiothrix nivea* hin und wieder lamellierte, säulenförmige Körper auf, da sie aber nicht immer zu beobachten sind, müssen wir die Frage noch offen lassen, ob hier nicht möglicherweise Artefaktbildungen vorliegen.

In Übereinstimmung mit Befunden von FAURÉ-FREMIET u. ROUILLER (1958) an *Thiovulum majus* haben auch wir weder bei *Beggiatoa* noch bei *Thiothrix* Strukturen gefunden, die an wohl definierte Mitochondrien erinnern könnten. In beiden Arten wird vielmehr der ganze Protoplast von einem verzweigten Tubulisystem durchzogen. Irgendeine Differenzierung in besondere Zellorganelle ist bei *Beg.* nicht zu erkennen.

Da *Beg.* ebenso wie die beweglichen Cyanophyceen in den Außenwänden längs der Querwandansatzstellen ein Porensystem besitzt, während der unbeweglichen *Thiothrix* diese Einrichtung fehlt, ist wohl anzunehmen, daß diesem Porensystem eine Bedeutung für die Bewegung zukommen muß. Sehr wahrscheinlich handelt es sich um Austrittsstellen für den Bewegungsschleim.

Die Untersuchungen der fadenförmigen Schwefelmikroben haben in verschiedener Beziehung eine Übereinstimmung mit den Cyanophyceen, besonders mit *Oscillatoria Borneti* ergeben. In einer ganzen Reihe von Strukturen sind aber auch Unterschiede vorhanden. Diese Unterschiede sind aber kein ausreichender Grund, eine Verwandtschaft etwa zwischen

*Oscillatoria* und *Beggiatoa* zu leugnen. Die stoffwechselphysiologischen Unterschiede zwischen diesen beiden Gattungen setzen auch bis zu einem gewissen Grade strukturelle Unterschiede voraus.

### Zusammenfassung

Fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Untersuchungen mit *Beggiatoa alba* und *Thiothrix nivea* brachten folgende Ergebnisse:

1. Mit Acridinorange läßt sich bei *Beg.* eine „Zentralsubstanz“ elektiv fluorchromieren. Diese „Zentralsubstanz“ nimmt fast die ganze Zelle ein. Bei *Thiothrix* leuchtet der gesamte Protoplast nach einer Fluorchromierung mit Acridinorange.

2. Weder mit basischen Farbstoffen + KOH noch mit der Feulgen-Reaktion kann in den beiden Schwefelmikroben ein „Chromidialapparat“ nachgewiesen werden.

3. Selbst nach einer Vitalfärbung mit Neutralrot sind weder in *Beggiatoa* noch in *Thiothrix* Vacuolen zu erkennen.

4. Die starke Speicherung von Indophenolblau bei der Nadi-Reaktion sowie der positive Ausfall der Nilrotfluorchromierung und der Sudan-schwarz B-Färbung weisen auf einen hohen Lipoidgehalt der schwefelhaltigen Zellen hin.

5. Schwefelfreie Zellen sind dagegen lipoidfrei. Es scheint ein direkter Zusammenhang zu bestehen zwischen Schwefel- und Lipoidgehalt.

6. Die Scheiden zeigen elektronenmikroskopisch eine Faserstruktur mit einer schwachen (*Beg.*) bzw. ausgeprägten (*Thiothrix*) Längsorientierung der Mikrofibrillen.

7. Längs- und Querwände sind zerstreutporig. Die deutlich einschichtigen Querwände lassen die Poren aber nicht in der Klarheit erkennen, wie es bei den chlorophyllführenden Cyanophyceen der Fall ist.

8. Die freibewegliche *Beg.* besitzt wie *Oscillatoria sancta* in den Außenwänden, längs der Querwandansatzstelle Porenketten. Die Poren haben eine durchschnittliche Weite von 13 m $\mu$ . Die unbewegliche *Thiothrix* zeigt keine derartigen Porensysteme.

9. Der Protoplast ist von einem verzweigten tubuliartigen System durchsetzt. Ein ausgeprägtes Lamellensystem wie bei den chlorophyllführenden Cyanophyceen ist nicht vorhanden. Irgendeine Differenzierung in besondere Zellorganelle ist bei *Beg.* nicht zu erkennen.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden in der Abteilung für Elektronenmikroskopie der Math.-naturw. Fakultät der Freien Universität Berlin gemacht. Fräulein K. ROSSINSKY danken wir vielmals für die Einführung in die Schneidetechnik. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sind wir für die Unterstützung unserer Arbeiten zu besonderem Dank verpflichtet.

## Literatur

- BAHR, H., u. W. SCHWARTZ: Biol. Zbl. **76**, 185 (1957). — DELAPORTE, B.: Rev. gen. bot. **51**, 615 u. f. (1939). — DEVIDÉ, Z.: Acta pharm. jugosl. **4**, 172 (1954), (zit. nach GEITLER 1955). — DRAWERT, H.: Planta (Berlin) **37**, 161 (1949). — Ber. dtsh. bot. Ges. **65**, 263 (1952); **66**, 134 (1953). — DRAWERT, H., u. H. GUTZ: Naturwissenschaften **40**, 512 (1953). — DRAWERT, H., u. I. METZNER: Ber. dtsh. bot. Ges. **69**, 291 (1956). — Z. Bot. **46**, 16 (1958). — DREWS, G., u. W. NIKLOWITZ: Arch. Mikrobiol. **24**, 147 (1956); **25**, 333 (1957). — FAURÉ-FREMIET, E., u. CH. ROULLER: Exp. Cell Res. **14**, 29 (1958). — GEITLER, L.: Cyanophyceae. In PASCHER: Süßwasserflora Deutschlands, Österreichs und der Schweiz, H. 12. Jena 1925. — In Fortschr. Bot. **17**, 2 (1955). — GUILLIERMOND, A.: Rev. gén. Bot. **38**, 129 (1926). — C. R. Acad. Sci. (Paris) **1933**, 182. — GUTZ, H.: Planta (Berlin) **46**, 481 (1956). — HARDER, R.: In Lehrbuch der Botanik für Hochschulen. 26. Aufl. Stuttgart 1954. — KRIEG, A.: Experientia (Basel) **10**, 204 (1954). — METZNER, I.: Arch. Mikrobiol. **22**, 45 (1955). — MIX, M.: Protoplasma (Wien) 1958 (im Druck). — NIKLOWITZ, W., u. G. DREWS: Arch. Mikrobiol. **23**, 123 (1955). — PERNER, E. S.: Biol. Zbl. **71**, 43 (1952). — PETTER, H. F. M.: C. R. Acad. Sci. (Paris) **1933**, 88. — POLJANSKY, G., u. G. PETRUSCHEWSKY: Arch. f. Protistenk. **67**, 11 (1929). — RIPPEL-BALDES, A.: Grundriß der Mikrobiologie: 3. Aufl. Berlin, Göttingen, Heidelberg 1955. — TISCHER, I.: Arch. Mikrobiol. **27**, 400 (1957). — ULLRICH, H.: Planta (Berlin) **9**, 144 (1929). — VATTER, A. E., u. R. S. WOLFE: J. Bact. **75**, 480 (1958). — WOHLFARTH-BOTTERMANN, K. E.: Naturwissenschaften **44**, 287 (1957). — ZASTROW, E. M. v.: Arch. Mikrobiol. **19**, 174 (1953).



## Autorenverzeichnis

- AGTHE, CL., s. WIKÉN, T. S. 189
- BORTELS, H., AUGUST RIPPEL-BALDES zum 70. Geburtstag. S. 1
- BRESCH, C., Grundlagen der Populationsgenetik von Bakteriophagen. S. 3
- BUKATSCH, F., Versuche zur Sichtbarmachung von Geißelaggregaten der Bakterien im Fluoreszenzmikroskop. S. 11
- CORBAZ, R., s. ETTLINGER, L., und R. HÜTTER, S. 326
- DRAWERT, H., und INGEBORG METZNER-KÜSTER, Fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Untersuchungen an *Beggiatoa alba* und *Thiothrix nivea*. VII. Mitteilung der Reihe: Zellmorphologische und zellphysiologische Studien an Cyanophyceen. S. 422
- DREWS, G., Untersuchungen über Granulabildung und Phosphateinbau in wachsenden Kulturen von *Mycobacterium phlei*. S. 16
- EMEIS, C. C., s. WINDISCH, S. S. 305
- ENGEL, H., und J. FRIEDERICHSEN, Die Carotinoide von *Mutinus caninus* Huds. S. 28
- ETTLINGER, L., R. CORBAZ und R. HÜTTER, Zur Systematik der Actinomyceten. 4. Eine Arzteilung der Gattung *Streptomyces* Waksman et Henrici. S. 326
- FISCHER, W. K., Über einige Wirkungen hoher Konzentrationen anionischer grenzflächenaktiver Substanzen auf Bakterien. S. 33
- FOSTER, J. W., s. MARTIN, H. H. S. 171
- FRANKE, W., und W. HEINEN, Zur Kenntnis des Fettsäureabbaus durch Schimmelpilze. I. Mitteilung. Über die Methylketonbildung durch Schimmelpilze. S. 50
- , —, Zur Kenntnis des Fettsäureabbaus durch Schimmelpilze. II. Mitteilung. Über Fettsäuredehydrogenasen aus Schimmelpilzen. S. 359
- FRIEDERICHSEN, J., s. ENGEL, H. S. 28
- FROMMER, W., Untersuchungen an Actinomycin I-bildenden Streptomyceten und deren Actinomycinen. S. 319
- FUCHS, W. H., und H. METZ, Über den Einfluß von Chinonoximbenzoylhydrazon auf das Wachstum von *Bacillus subtilis*. S. 60
- GALLWITZ, E., s. KÜHLWEIN, H. S. 139
- GIELESSSEN, J., s. KÜSTER, E. S. 157
- GIESBRECHT, P., und G. PIEKARSKI, Zur Organisation des Zellkerns von *Bacillus megaterium*. S. 68
- HARDER, R., und E. UEBELMESSER, Über die Beeinflussung niederer Erdphycomyceten durch Flechten. S. 82
- HASE, E., Y. MORIMURA, S. MIHARA and H. TAMIYA, The Role of Sulfur in the Cell Division of *Chlorella*. S. 87
- HEINEN, W., s. FRANKE, W. S. 50
- , s. FRANKE, W. S. 359
- HELWIG, R., Ein Beitrag zur mikrobiologischen Methode der Vitamin B<sub>6</sub>-Bestimmung speziell im Pansen. S. 96
- HORVÁTH, J., Dauernde Heterocaryose bei einer *Streptomyces*-Art mit verlängerter Sporulationsfähigkeit. S. 101
- HÜTTER, R., s. ETTLINGER, L., und R. CORBAZ, S. 326
- JANKE, A., und M. RÖHR, Über den Einfluß der Ernährung auf die Protein-Zusammensetzung von Essigbakterien. S. 106
- JANNASCH, H. W., Schwellenkonzentrationen verschiedener Stickstoffquellen für die Vermehrung einiger Bakterien aus nährstoffarmen Gewässern. S. 114
- JENDRALSKI, U., s. STEINER, M., und H. KATING, S. 244
- JENSEN, H. L., s. NORRIS, J. R. S. 198
- JÜRGENS, C., Physiologische und genetische Untersuchungen über die Fruchtkörperbildung bei *Schizophyllum commune*. S. 388
- KATING, H., s. STEINER, M., und U. JENDRALSKI, S. 244
- KNÖLL, H., und W. NIKLOWITZ, Zur Feinstruktur der *Sarcina ventriculi*. S. 125



- KÜHLWEIN, H., und E. GALLWITZ, *Polyangium violaceum* nov. spec. Ein Beitrag zur Kenntnis der Myxobakterien. S. 139
- KUNISAWA, R., und R. Y. STANIER, Studies on the Role of Carotenoid Pigments in a Chemoheterotrophic Bacterium, *Corynebacterium poinsettiae*. S. 146
- KÜSTER, E., und J. GIELESSEN, Der Einfluß sehr hoher Drücke auf *Aspergillus niger*. S. 157
- LOCHHEAD, A. G., Two New Species of *Arthrobacter* Requiring Respectively Vitamin B<sub>12</sub> and the Terregens Factor. S. 163
- MARTIN, H. H., und J. W. FOSTER, On the Chromatographic Behaviour of Dipicolinic Acid. S. 171
- METZ, H., s. FUCHS, W. H. S. 60
- METZNER-KÜSTER, INGEBORG, s. DRAWERT, H. S. 422
- MEYER, R., und K. MEYER-PIETSCHMANN, Die Wirkung der Bestrahlung mit ultraviolettem Licht auf Mikroorganismen, untersucht an Einzelkulturen. S. 179
- MEYER-PIETSCHMANN, K., s. MEYER, R. S. S. 179
- MIHARA, S., s. HASE, E., H. TAMIYA and Y. MORIMURA, S. 87
- MORIMURA, Y., s. HASE, E., S. MIHARA and H. TAMIYA, S. 87
- NIKLOWITZ, W., s. KNÖLL, H. S. 125
- NILSSON, G., s. NILSSON, R. S. 191
- NILSSON, R., und G. NILSSON, Studies concerning Swedich ropy milk. The antibiotic qualities of ropy milk. S. 191
- NORRIS, J. R., und H. L. JENSEN, Calcium Requirements of *Azotobacter*. S. 198
- PFENNIG, N., Beobachtungen des Wachstumsverhaltens von Streptomyceten auf Rossi-Cholodny-Aufwuchsplatten im Boden. S. 206
- PIEKARSKI, G., s. GIESBRECHT, P. S. 68
- POSTERNAK, TH., s. SCHOPFER, W. H. S. 240
- PRÄVE, P., Der Actinomycin-Einfluß auf den Stoffwechsel von *Candida albicans*. S. 217
- RADLER, F., Untersuchung des biologischen Säureabbaus im Wein. III. Die Energiequelle der Äpfelsäure-abbauenden Bakterien. S. 224
- RINGS-WILLEKE, L., s. WINTER, A. G. S. 311
- RÖHR, M., s. JANKE, A. S. 106
- SCHLEGEL, H., G. Myxoxanthophyll als Hauptcarotinoid von *Mycobacterium phlei*. S. 231
- SCHOPFER, W. H., et TH. POSTERNAK, Action d'antiinositols sur *Neurospora crassa* »inositolless« cultivé en milieu hautement purifié. S. 240
- SCHUSSNIG, B., Der Feinbau der Plastiden von *Rhopalocystis oleifera*. S. 379
- STANIER, R. Y., s. KUNISAWA, R. S. 146
- STEINER, M., H. KATING und U. JENDRALSKI, Der Einfluß von Mg-Mangel auf die Fett- und Eiweißbildung von *Endomycopsis vernalis*. S. 244
- STILLE, B., Beobachtungen über das Verhalten von *Azotobacter* im Wurzelbereich höherer Pflanzen. S. 255
- STOLP, H., Über die spontane Mutation von Phagenresistenz nach Phagensensibilität. S. 262
- STOSCH, H. A. v., Entwicklungsgeschichtliche Untersuchungen an zentrischen Diatomeen. III. Die Spermatogenese von *Melosira moniliformis* Agardh. S. 274
- TAHA, EZZ EL-DIN M., and TAHANI A. EL-ZEINI, The influence of Zinc, Copper, Iron and Manganese on the Mycological Production of Citric Acid in Surface Cultures. S. 283
- TAHANI, A. EL-ZEINI, s. TAHA, EZZ EL-DIN M. S. 283
- TAMIYA, H., s. HASE, E., Y. MORIMURA and S. MIHARA. S. 87
- UEBELMESSER, E., s. HARDER, R. S. 82
- WIKÉN, T., und CL. AGTHE, Über die Wechselwirkung der Wuchsstoffe meso-Inosit, (+)-Biotin, D (+)-Pantothensäure,  $\beta$ -Alanin und D (-)-Pantoinsäure bei der Kulturweihenhefe „Dezaley“ (*Saccharomyces cerevisiae* Hansen). S. 289
- WINDISCH, S., und C. C. EMEIS, Versuche zur Erklärung der Schwimmfähigkeit von Kahlmhefezellen. S. 305
- WINTER, A. G., und L. RINGS-WILLEKE, Untersuchungen über den Einfluß von Senfölen auf die Vermehrung des Influenza-Virus im embryonierten Hühnerei. S. 311.

## Aufnahmebedingungen

Die Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören und wissenschaftlich Neues bringen. Arbeiten, die ausschließlich praktischen Zwecken dienen, scheiden aus.

Bei Arbeiten aus Instituten, Kliniken usw. ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben und völlig druckfertig sein; andernfalls sind Verzögerungen im Erscheinen unvermeidlich. Korrekturen im Satz müssen auf das sachlich Notwendige beschränkt werden.

Die Darstellung soll möglichst kurz sein. Ergebnisse dürfen nicht gleichzeitig in Tabellen- und Kurvenform dargestellt werden.

Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken, insbesondere die Reproduktion von Photos. Vorlagen für Diagramme sind in etwa doppelter Reproduktionsgröße erwünscht.

Bei einleitenden Literaturbesprechungen soll möglichst auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen und nur das zum unmittelbaren Verständnis Notwendige gebracht werden.

Selbständige kritische Sammelreferate über einzelne Gebiete sind erwünscht.

Der Arbeit ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse im Umfang von im allgemeinen höchstens 1 Seite anzufügen.

---

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

## Enzymopathologie

### Enzyme in Klinik und Forschung

Von Dr. med. **Roland Richterich**, Basel. Mit 132 Abbildungen.

XVI, 703 Seiten Gr.-8°. 1958.

Ganzleinen DM 128,—

Inhaltsübersicht: **I. Biologie der Enzyme.** Biochemie der Enzyme. Stoffwechsel und submikroskopische Struktur der Zelle. Biologie der Enzyme. Biokatalytische Systeme. — **II. Allgemeine Enzymo-Pathologie.** Enzymo-Pathologie. Heredofamiliäre Hyp- und Anenzymien („Chemische Mißbildungen“). Ernährungsstörungen. Hormone. Krebs. Biologische Proteolyse. Wirkung exogener Noxen. — **III. Spezielle Enzymo-Pathologie.** Bindegewebe. Knochensystem. Muskulatur. Herz und Kreislauf. Magen. Pankreas. Leber. Niere. Männliche Geschlechtsorgane. — Namen- und Sachverzeichnis.

---

**SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG**



# Pathologie der Laboratoriumstiere

Bearbeitet von W. Bargmann, V. Becker, J. Berberich, P. Cohrs, J. Dobberstein, W. Doerr, W. Eickhoff, R. Fankhauser, K. Fischer, E. Frauchiger, B. v. Gavallér, H. Gebauer, L. Gerhard, K. Häupl, F. Henschen, E. Hieronymi, G. Hieronymi, G. Hoffmann, R. Jaffé, G. Kelemen, H. Köhler, W. Kötsche, R. Krahnert, A. Lauche, G. Liebegott, H. Meessen, H. Mendheim, H.-J. Merté, E. Mitscherlich, H. Nachtsheim, G. Pallaske, E. Preissecker, E. Randerath, W. Renk, H. Röhrer, W. Rohrschneider, S. Rubarth, S. Schermer, H. G. Schlumberger, F. Schulte, L.-C. Schulz, O. Stochdorph, H. Stünzi, Ch. Tamaschke, E. Thomas, G. Veith, H. Wunderer. Herausgegeben von P. Cohrs, Hannover, R. Jaffé, Caracas, H. Meessen, Düsseldorf. Mit 612 zum Teil farbigen Abbildungen. XX, 799 und XVI, 803 Seiten Gr.-8°. 1958. In zwei Bänden, die nur zusammen abgegeben werden. Ganzleinen DM 298,—

Inhaltsübersicht: **Erster Band: Kreislauforgane:** Herz. — Gefäße. — **Respirationsorgane:** Erkrankungen der Nase. — Trachea, Bronchien, Lungen und Pleura. — **Verdauungsorgane:** Mundhöhle, Zähne, Zahnhalteapparat. — Speiseröhre, Magen, Darm und Bauchfell. — Bauchspeicheldrüse. — Leber- und Gallenwege. — **Blut und blutbildende Organe:** Blut. — Knochenmark (einschließlich Leukose). — Lymphknoten. — Milz. — **Urogenitalsystem:** Erkrankungen der Harnorgane. — Männliche Genitalorgane. — Weibliche Genitalorgane. — **Endokrine Drüsen:** Hypophyse. — Epiphysis cerebri. — Schilddrüse. — Thymus. — Epithelkörperchen. — Nebennieren. — **Bewegungssystem:** Knochen und Gelenke. — Muskeln und Sehnen. — **Haut.** — **Sinnesorgane:** Sehorgan: Normale Anatomie. Pathologische Anatomie. — Erkrankungen des Ohres. — **Nervensystem:** Normale Anatomie und Allgemeine Pathologie. — Entzündliche Spontanerkrankungen. — Degenerative Spontanerkrankungen. — Erkrankungen peripherer Nerven. — Tumoren. — **Zweiter Band: Durch Bakterien und pflanzliche Parasiten hervorgerufene Infektionskrankheiten.** — **Virusbedingte Krankheiten.** — **Tierische Parasiten und parasitäre Krankheiten.** — **Serologische Diagnostik der Spontanerkrankungen der kleinen Laboratoriumstiere.** — **Durch Umwelt- und Ernährungseinflüsse bedingte Krankheiten (einschl. Avitaminosen).** — **Erbpathologie der Nagetiere.** — **Gerontologie.** — **Tumoren.** — **Besondere Tierarten: Krankheiten der Vögel (Tauben, Papagei, Kanarienvogel).** — **Krankheiten der Fische, Amphibien und Reptilien.** — **Literatur zu jedem Beitrag.** — **Sachverzeichnis für den ersten und zweiten Band.**

**SPRINGER-VERLAG/BERLIN·GÖTTINGEN·HEIDELBERG**